

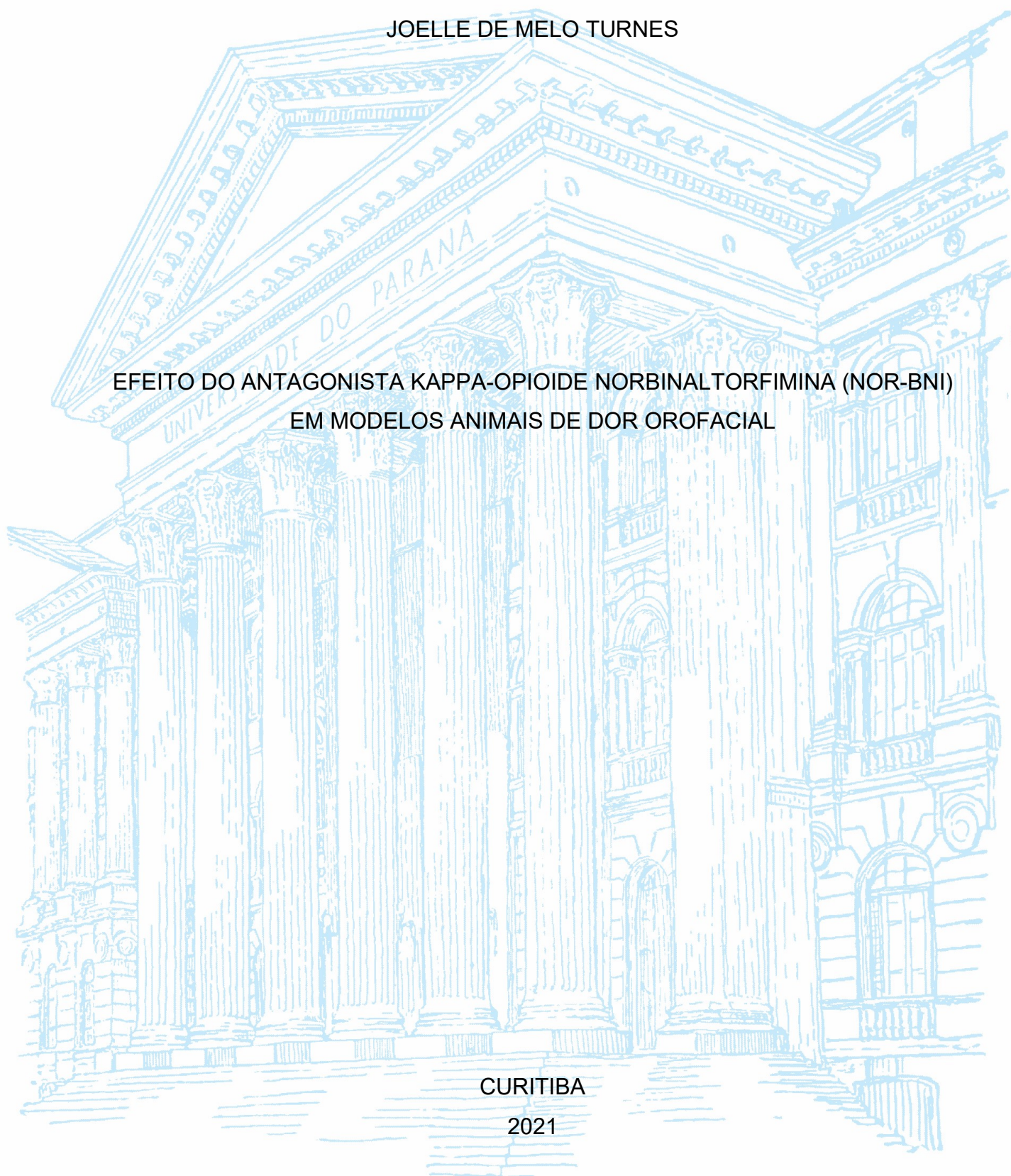
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

JOELLE DE MELO TURNES

EFEITO DO ANTAGONISTA KAPPA-OPIOIDE NORBINALTORFIMINA (NOR-BNI)  
EM MODELOS ANIMAIS DE DOR OROFACIAL

CURITIBA

2021



JOELLE DE MELO TURNES

EFEITO DO ANTAGONISTA KAPPA-OPIOIDE NORBINALTORFIMINA (NOR-BNI)  
EM MODELOS ANIMAIS DE DOR OROFACIAL

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação em Farmacologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Farmacologia.

Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Juliana Geremias Chichorro

Coorientador(a): Prof(a). Dr(a). Janaína Menezes Zanoveli

CURITIBA

2021



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO FARMACOLOGIA -  
40001016038P0

## TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em FARMACOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **JOELLE DE MELO TURNES** intitulada: **EFEITO DO ANTAGONISTA KAPPA-OPIOIDE NORBINALTORFIMINA (NOR-BNI) EM MODELOS ANIMAIS DE DOR OROFACIAL**, sob orientação da Profa. Dra. JULIANA GEREMIAS CHICHORRO, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 25 de Fevereiro de 2021.

Assinatura Eletrônica  
02/03/2021 11:13:39.0  
JULIANA GEREMIAS CHICHORRO  
Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica  
02/03/2021 11:07:15.0  
ROBERTO ANDREATINI  
Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica  
02/03/2021 11:30:01.0  
LUANA FISCHER  
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica  
02/03/2021 14:04:41.0  
LUIZ EDUARDO NUNES FERREIRA  
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE GUARULHOS)

## **AGRADECIMENTOS**

A meu pai, por não medir esforços e me incentivar ao longo de toda a minha vida, principalmente relacionado a minha educação. Pelo amor incondicional, carinho, orações e paciência.

À minha mãe, pelo amor incondicional, carinho, orações e conselhos.

Ao meu marido Rafael, por todo amor, carinho, companheirismo, amizade, apoio, incentivo e por tornar meu dia a dia muito mais feliz.

À minha orientadora Dr<sup>a</sup> Juliana Geremias Chichorro, por me aceitar de braços abertos, pela confiança, motivação, compreensão, conselhos e ensinamentos valiosos e pela maravilhosa orientação.

A Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Janaína Menezes Zanoveli pela excelente co-orientação, por participar ativamente da elaboração do projeto e dar importantes sugestões durante todo o meu doutorado.

Aos meus amigos e colegas do grupo da Dor Orofacial, especialmente a Érika, Amanda, Darciane e Laura pela colaboração nos experimentos, pela amizade, risadas, paciência, motivação e incentivo em muitos momentos.

Aos meus amigos e colegas da Farmacologia pela amizade, conversas e risadas e por tornarem a jornada mais suave.

Aos meus amigos da vida toda por tornarem tudo mais fácil.

À minha querida e amada família.

Professores e funcionários do Departamento de Farmacologia da UFPR pelos ensinamentos, ajuda, assistência e apoio.

Aos membros da banca Luana Fischer, Luiz Eduardo Nunes Ferreira, Roberto Andreatini e suplentes Bruno Jacson Martynhak, Felipe Lukacievicz Barbosa por terem aceitado o convite e se disponibilizado a contribuir com o trabalho;

À UFPR por toda a minha formação e crescimento profissional e pessoal.

A todos os animais usados nos experimentos.

À CAPES e ao CNPq pelo apoio financeiro

*“A scientist in his laboratory is not a mere technician: he is also a child confronting natural phenomena that impress him as though they were fairy tales”*

Marie Curie



## RESUMO

Em alguns modelos de dor que afetam o sistema trigeminal tem sido demonstrado que antagonistas de receptores kappa opioides (KOR), como o norbinaltorfimina (nor-BNI) apresentam efeitos antinociceptivos. Além disso, seus efeitos do tipo ansiolíticos já foram extensamente demonstrados na literatura em estudos não-clínicos. Antagonistas de KOR possuem algumas vantagens em relação à outros tratamentos para a dor, como por exemplo, a morfina. Os antagonistas de KOR não promovem dependência e podem tratar comorbidades frequentes na dor crônica, tal como a ansiedade. O presente estudo teve como objetivo investigar o efeito do antagonista de KOR na dor aguda pós-operatória orofacial (etapa 1) e na dor neuropática trigeminal (etapa 2) usando o modelo da constrição do nervo infraorbital (CION), assim como avaliar seu efeito na ansiedade associada a CION. Ratos Wistar machos foram submetidos a incisão da mucosa oral, após 3 dias foram tratados com nor-BNI ou veículo, sendo realizada na sequência a avaliação da hiperalgesia térmica e mecânica para avaliar seu efeito na dor aguda orofacial. O tratamento com nor-BNI foi capaz de reduzir a hiperalgesia mecânica e térmica por até 5 e 6 horas, respectivamente. Estes resultados da etapa 1 sugerem que antagonistas de KOR podem ser úteis no tratamento da dor aguda pós-operatória orofacial. Na etapa 2, utilizamos o modelo animal da neuralgia do trigêmeo induzido por CION cujo objetivo foi investigar o efeito local, central e sistêmico do antagonista de KOR na dor e na ansiedade. Os animais foram tratados com o nor-BNI no gânglio do trigêmeo (TG), no subnúcleo *caudalis* (SC), na amígdala central (CeA) e sistemicamente (via i.p.), 14 dias após a cirurgia de CION. Após o tratamento, foi realizado um decurso temporal da hiperalgesia mecânica. No TG, o antagonista de KOR reduziu o limiar mecânico dos animais de 2 à 4 horas após sua administração. Quando o nor-BNI foi administrado no SC, não foi observado nenhuma alteração da nocicepção e do comportamento tipo-ansioso. Porém, quando administrado na CeA, o nor-BNI reverteu a hiperalgesia mecânica de 4 a 6 horas, mas não promoveu uma alteração no comportamento tipo-ansioso. Por fim, foi observado que o tratamento sistêmico com nor-BNI reduziu a hiperalgesia mecânica dos animais de 1 a 4 horas. Com relação ao comportamento tipo-ansioso, no teste do labirinto em cruz elevado houve um aumento do tempo nos braços abertos e do número de entradas nos braços abertos, indicativo de um efeito do tipo ansiolítico. Este mesmo efeito foi observado quando esses animais foram avaliados em outro teste de ansiedade, o teste de transição claro-escuro, ou seja, foi verificado um aumento do tempo no compartimento claro. O presente estudo demonstrou o efeito antinociceptivo do antagonista de KOR, nor-BNI, em modelos de dor orofacial pós-operatória e neuropática. Ademais, demonstrou que seu efeito antinociceptivo na dor neuropática parece envolver mecanismos periféricos e centrais, enquanto que o mecanismo do efeito do tipo ansiolítico não foi determinado neste trabalho. Portanto, antagonistas de KOR podem representar uma alternativa terapêutica aos tratamentos existentes para dores de origem orofacial, bem como a ansiedade potencialmente associada ao quadro de dor.

Palavras-chave: ratos, incisão; dor pós-operatória; constrição do nervo infraorbital neuralgia do trigêmeo; ansiedade; opioide.

## ABSTRACT

It has been shown that kappa opioid receptor (KOR) antagonists, such as nor-binaltorphimine (nor-BNI), have antinociceptive effects in some pain models that affect the trigeminal system. In addition, its anxiolytic-like effects have been extensively demonstrated in the literature and are currently evaluated on clinical trials. These drugs have some advantages over treatments widely used for pain, such as morphine. KOR antagonists do not promote addiction and can treat frequent comorbidities in chronic pain, such as anxiety. The present study aimed to investigate the effect of the KOR antagonist on acute postoperative orofacial pain (step 1) and trigeminal neuropathic pain (step 2) using the infraorbital constriction model (CION), as well as to evaluate its effect on anxiety associated with this model. Male Wistar rats were submitted to the incision of oral mucosa. After 3 days they were treated with nor-BNI or vehicle, followed by the assessment of thermal and mechanical hyperalgesia to evaluate its effect on acute orofacial pain. Treatment with nor-BNI was able to reduce mechanical and thermal hyperalgesia up to 5 and 6 hours, respectively. These step 1 results suggest that kappa opioid antagonists may be useful in the treatment of acute postoperative orofacial pain. In the step 2, it was used the animal model of trigeminal neuralgia and the objective was to investigate the local, central and systemic effect of the KOR antagonist on pain and anxiety. The animals were treated with nor-BNI in the trigeminal ganglion (TG), subnucleus *caudalis* (SC), right central amygdala (CeA) and intraperitoneally 14 days after CION surgery. Following the treatment, a time course of mechanical hyperalgesia was performed. In the TG, the KOR antagonist reduced animal's mechanical threshold from 2 to 4 hours after its administration. When administered in the SC, no changes in nociception and anxiety-like behavior were observed. However, when administered in the right CeA, nor-BNI reversed mechanical hyperalgesia from 4 to 6 hours, but it did not promote changes in anxiety-like behavior. Finally, it was observed that systemic treatment with nor-BNI, only in the highest dose (10 mg/kg), reduced the mechanical hyperalgesia of the animals from 1 to 4 hours. As for the anxiety-like behavior, in the elevated plus-maze test (EPM), there was an increase in time in the open arms for both doses (3 and 10 mg/kg) and in the number of entries in the open arms (3 mg/kg). In the light-dark transition test (LDT), an increase in time in the light compartment (3 mg/kg) was observed. Indicating the anxiolytic-like effect of nor-BNI, mainly at the dose of 3 mg/kg. The present study demonstrated the antinociceptive effect of the KOR antagonist, nor-BNI, in models of orofacial postoperative pain and neuropathic pain. In addition, the antinociceptive effect observed in the model of trigeminal neuralgia seems to involve peripheral and central mechanisms, while the anxiolytic-like effect mechanism was not determined in the present work. Therefore, nor-BNI can represent a therapeutic alternative to existing treatments for pain of orofacial origin, as well as to anxiety potentially associated to orofacial pain conditions.

Keywords: rat; incision; postoperative pain; constriction of the infraorbital nerve; trigeminal neuralgia; anxiety; opioid.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – PROTOCOLO DO EXPERIMENTO 1.....	37
FIGURA 2 – PROTOCOLO DO EXPERIMENTO 2.....	37
FIGURA 3 – PROTOCOLO DO EXPERIMENTO 3.....	38
FIGURA 4 - PROTOCOLO DO EXPERIMENTO 4 .....	39
FIGURA 5 - PROTOCOLO DO EXPERIMENTO 5 .....	39
FIGURA 6 - DECURSO TEMPORAL DO EFEITO DO NOR-BNI ADMINISTRADO NA MUCOSA ORAL NA HIPERALGESIA TÉRMICA (PAINEL A) E MECÂNICA (PAINEL B) NO MODELO DE INCISÃO. ....	42
FIGURA 7 - DECURSO TEMPORAL DO EFEITO DO NOR-BNI ADMINISTRADO NO TG NA HIPERALGESIA MECÂNICA PROMOVIDA PELO CION. .....	43
FIGURA 8 - EFEITO DO NOR-BNI ADMINISTRADO NO TG SOBRE O COMPORTAMENTO DO TIPO-ANSIOSO APÓS CION .....	44
FIGURA 9 - DECURSO TEMPORAL DO EFEITO DE NOR-BNI ADMINISTRADO NO SC NA HIPERALGESIA MECÂNICA PROMOVIDA PELA CION. .....	45
FIGURA 10 - VERIFICAÇÃO DA HIPERALGESIA MECÂNICA APÓS CION.....	46
FIGURA 11 – EFEITO DO NOR-BNI ADMINISTRADO NO SC SOBRE O COMPORTAMENTO DO TIPO-ANSIOSO APÓS CION .....	46
FIGURA 12 – DECURSO TEMPORAL DO EFEITO DO NOR-BNI ADMINISTRADO NO NÚCLEO CEA NA HIPERALGESIA MECÂNICA PROMOVIDA PELA CION.....	48
FIGURA 13 - VERIFICAÇÃO DA HIPERALGESIA MECÂNICA APÓS CION .....	48
FIGURA 14 – EFEITO DO TRATAMENTO INTRA-AMIGDALAR COM NOR-BNI SOBRE O COMPORTAMENTO DO TIPO-ANSIOSO APÓS CION. .	49
FIGURA 15 - DECURSO TEMPORAL DO NOR-BNI ADMINISTRADO PELA VIA INTRAPERITONEAL NA HIPERALGESIA MECÂNICA PROMOVIDA PELA CION.....	51
FIGURA 16 – EFEITO DO NOR-BNI ADMINISTRADO PELA VIA INTRAPERITONEAL SOBRE O COMPORTAMENTO DO TIPO- ANSIOSO ATRAVÉS DO LCE APÓS CION.....	52



FIGURA 17 – EFEITO DO NOR-BNI ADMINISTRADO PELA VIA INTRAPERITONEAL SOBRE O COMPORTAMENTO DO TIPO- ANSIOSO ATRAVÉS DO TCE APÓS CION.....	53
--	----

## LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

ANOVA	- Análise de variância
a.p.i.	- Água para Injeção
BLA	- Amígdala basolateral
CeA	- Núcleo central da amígdala
CEUA	- Comissão de Ética no Uso de Animais
CION	- Constrição do nervo infraorbital
CRF	- Fator liberador de corticotrofina
DNIC	- Controle inibitório nocivo difuso
EPM	- Erro padrão da média
IASP	- Associação Internacional para o Estudo da Dor
ICOP	- Classificação Internacional de Dores Orofaciais
i.c.v.	- Intracerebroventricular
i.p.	- Intraperitoneal
i.t.	- Intratecal
KOR	- Receptores kappa opioides
LCE	- Labirinto em cruz elevado
MAPK	- Proteína quinase ativada por mitogênio
MOR	- Receptores mu opioides
Nav	- Canais de sódio voltagem dependente
NNT	- Número necessário para tratar
nNOS	- Óxido nítrico sintase neuronal
Nor-BNI	- Norbinaltorfimina
NO	- Óxido nítrico
pION	- Ligadura parcial do nervo infraorbital
s.c.	- Subcutânea
SC	- Subnúcleo <i>caudalis</i>
SNC	- Sistema nervoso central
SNL	- Ligadura do nervo espinal
SNP	- Sistema Nervoso Periférico
TCE	- Transição claro-escuro

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>13</b>
<b>2 JUSTIFICATIVA</b>	<b>16</b>
<b>3 OBJETIVOS</b>	<b>18</b>
3.1 OBJETIVO GERAL	18
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
<b>4 REVISÃO DE LITERATURA</b>	<b>19</b>
4.1 DORES OROFACIAIS	19
4.2 DOR PÓS OPERATÓRIA	20
4.2.1 MODELO DE DOR PÓS OPERATÓRIA	21
4.2.2 DOR NEUROPÁTICA	22
4.2.3 NEURALGIA DO TRIGÊMEO	23
4.2.3.1 MODELO DE DOR NEUROPÁTICA OROFACIAL	25
4.3 RELAÇÃO ENTRE DOR CRÔNICA E ANSIEDADE	25
4.4 SISTEMA KAPPA OPIOIDE	27
4.4.1 NOR-BNI	29
<b>5 MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>30</b>
5.1 ANIMAIS	30
5.2 DROGAS, REAGENTES E SOLUÇÕES	30
5.3 MÉTODOS DE ADMINISTRAÇÃO DE DROGAS	31
5.3.1 Injeção na mucosa oral	31
5.3.2 Injeção intraganglionar	31
5.3.3 Injeção medular subaracnóide	31
5.3.4 Injeção intra-amigdalal	32
5.4 MODELOS DE DOR OROFACIAL	33
5.4.1 Incisão da mucosa oral	33
5.4.2 Constricção do nervo infraorbital (CION)	33
5.5 AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO NOCICEPTIVO	34
5.5.1 Hiperálgia ao calor	34
5.5.2 Hiperálgia mecânica	34
5.6 AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO TIPO-ANSIOSO	35
5.6.1 Labirinto em cruz elevado	35

5.6.2 Transição claro-escuro .....	35
5.7 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS .....	36
5.7.1 Experimento 1 – Avaliação temporal do tratamento com nor-BNI na hiperalgesia térmica e mecânica na dor pós operatória .....	37
5.7.2 Experimento 2 - Avaliação temporal do efeito do nor-BNI administrado no gânglio do trigêmeo na hiperalgesia mecânica induzida por CION .....	37
5.7.3 Experimento 3 - Avaliação temporal do efeito do nor-BNI administrado no subnúcleo <i>caudalis</i> na hiperalgesia mecânica e no comportamento do tipo-ansioso induzido por CION .....	38
5.7.4 Experimento 4 - Avaliação temporal do efeito do nor-BNI na amígdala na hiperalgesia mecânica e no comportamento do tipo-ansioso induzido por CION .....	38
5.7.5 Experimento 5 - Avaliação temporal do tratamento sistêmico com nor-BNI na hiperalgesia mecânica e no comportamento do tipo-ansioso induzido por CION .....	39
5.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	40
<b>6 RESULTADOS.....</b>	<b>41</b>
6.1 EXPERIMENTO 1 - AVALIAÇÃO TEMPORAL DO EFEITO DO NOR-BNI ADMINISTRADO NA MUCOSA ORAL NA HIPERALGESIA TÉRMICA E MECÂNICA NA DOR PÓS-OPERATÓRIA .....	41
6.2 EXPERIMENTO 2: AVALIAÇÃO TEMPORAL DO EFEITO DO NOR-BNI ADMINISTRADO NO TG NA HIPERALGESIA MECÂNICA INDUZIDA POR CION .....	42
6.3 EXPERIMENTO 3: AVALIAÇÃO TEMPORAL DO EFEITO DO NOR-BNI ADMINISTRADO VIA SUBARACNÓIDE NA HIPERALGENSIA MECÂNICA E NO COMPORTAMENTO DO TIPO-ANSIOSO INDUZIDO POR CION .....	44
6.4 EXPERIMENTO 4 – AVALIAÇÃO TEMPORAL DO EFEITO DO NOR-BNI NO NÚCLEO CEA NA HIPERALGESIA MECÂNICA E NO COMPORTAMENTO TIPO- ANSIOSO INDUZIDA POR CION .....	47
6.5 EXPERIMENTO 5 - AVALIAÇÃO TEMPORAL DO TRATAMENTO SISTÊMICO COM NOR-BNI NA HIPERALGESIA MECÂNICA E NO COMPORTAMENTO TIPO- ANSIOSO INDUZIDO POR CION .....	49
<b>7 DISCUSSÃO .....</b>	<b>53</b>
<b>8 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>62</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>63</b>
<b>ANEXO – CERTIFICADO CEUA.....</b>	<b>76</b>

## 1 INTRODUÇÃO

De acordo com a nova definição de dor pela Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP), dor é uma experiência sensorial e emocional desagradável associada ou semelhante àquela associada a dano real ou potencial ao tecido (IASP, 2020). A dor é um mecanismo de defesa do nosso organismo, sendo responsável por nos alertar sobre estímulos danosos e garantir a nossa sobrevivência (JULIUS; BASBAUM, 2001). É uma experiência complexa e multidimensional que possui fatores cognitivos, emocionais e sensoriais (SESSLE, 2005). No entanto, a dor pode passar por mudanças mal adaptativas e se tornar crônica (JULIUS; BASBAUM, 2001; MASSALY; MORÓN; AL-HASANI, 2016). Dores que afetam a região oral e maxilofacial apresentam alta prevalência, atingindo cerca de 10-26% da população mundial (SHAEFER; KHAWAJA; BAVIA, 2018). Algumas dessas condições dolorosas, como por exemplo a neuralgia do trigêmeo, são de difícil diagnóstico e as opções de tratamento farmacológico são limitadas e associadas a inúmeros efeitos adversos. Importante ressaltar que dores orofaciais recrutam uma neurocircuitaria distinta daquela recrutada em outros tipos de dores, que não orofaciais (COLLOCA et al., 2017; SESSLE, 2000, 2005). Nesse aspecto, estudos recentes têm demonstrado que diferentes tipos de dores orofaciais recrutam uma via monossináptica do gânglio do trigêmeo (TG) para o núcleo parabraqueal, uma estrutura-chave para o componente afetivo da dor, o que justificaria dados clínicos de que pacientes com dores nessas regiões apresentam uma carga emocional maior (RODRIGUEZ et al., 2017). Desse modo, é importante separar os estudos que envolvam dores orofaciais de outros que envolvam outros tipos de dor, aprofundando os estudos não clínicos de dores orofaciais para obter tratamentos específicos e translacionais.

A cirurgia é uma das principais causas de síndromes de dor aguda e, em muitos casos leva a cronificação da dor, sendo que a presença de dor, intensidade e o tempo de cirurgia, são fatores preditivos do desenvolvimento de dor crônica (APFELBAUM et al., 2003; GAN, 2017; GLARE; AUBREY; MYLES, 2019; PAK et al., 2018). Apesar do aumento de estudos nessa área, muitos pacientes ainda sofrem de dores severas no pós-cirúrgico. Portanto, a descoberta de novos alvos terapêuticos para o desenvolvimento de terapias mais eficazes e com menos efeitos adversos do

que os atuais tratamentos são necessários (POGATZKI-ZAHN; SEGELCKE; ZAHN, 2018).

Outro tipo de dor orofacial que, apesar de não ser tão prevalente (0,03-0,3%) na população, afeta drasticamente a qualidade de vida dos pacientes, é a neuralgia do trigêmeo. A neuralgia do trigêmeo é um tipo de dor neuropática severa caracterizada por ataques paroxísticos, i.e., ataques fortes de dores unilaterais, curtos e recorrentes na área inervada por um ou mais ramos do trigêmeo. Esta é uma condição frequentemente mal diagnosticada e confundida com outras doenças e possui tratamento mais restrito do que outros tipos de dores neuropáticas (COLLOCA et al., 2017; DE TOLEDO et al., 2016; ZAKRZEWSKA et al., 2017; ZAKRZEWSKA; MCMILLAN, 2011). O impacto da neuralgia do trigêmio na qualidade de vida é tão grande que, frequentemente leva ao suicídio, pois é associada com depressão e ansiedade. Infelizmente, cerca de 90% dos pacientes possuem uma dessas desordens e 30% deles não são adequadamente tratados (MAČIANSKYTĖ et al., 2011; ZAKRZEWSKA et al., 2017).

Os transtornos de ansiedade são um grupo de desordens mentais caracterizadas pelo medo persistente e excessivo, ansiedade e/ou aversão de ameaças internas ou externas reais ou potenciais. Essas desordens podem ser consideradas como uma falha na evocação de respostas adaptativas ou uma inibição de respostas mal adaptativas em determinadas situações (AMSTADTER, 2008; HIDALGO VICARIO; RODRÍGUEZ HERNÁNDEZ, 2013).

Apesar das evidências clínicas, existem poucos estudos que avaliam a relação da dor e ansiedade em pacientes e em modelos animais de dores orofaciais. Nesse sentido, um potencial alvo para o controle de ambas as desordens é o sistema kappa opioidérgico que, além de atuar no sistema opioide, um importante alvo de controle da dor e da ansiedade, não possui os efeitos adversos de outras drogas opioides clássicas, tal como a morfina, que pode desencadear depressão respiratória e dependência (BOOM et al., 2012; TRANG et al., 2015). Apesar das evidências do sistema kappa opioidérgico no controle de dor e ansiedade, pouco se conhece do funcionamento desse sistema no sistema trigeminal em condições de dor, e também de ansiedade associada a dor orofacial.

Na dor pós-operatória, opioides como a morfina são muito utilizados no alívio da dor. Apesar de terem uma grande eficácia, o uso da morfina está associado com graves problemas de saúde pública, como já supracitado, ressaltando o seu alto



potencial de dependência desencadeando o transtorno por uso de opioides. Assim, tendo em vista a crise de opioides em muitos países desenvolvidos, o estudo de alternativas com potencial efeito analgésico como o sistema kappa opioidérgico, que não promova o transtorno por uso de opioides, é claramente importante e urgente. Por outro lado, o estudo do sistema dinorfina/kappa opioide na dor neuropática é relevante dado que opioides que atuam nos receptores  $\mu$  (mu) opioide, como a morfina, muitas vezes não promovem o alívio adequado da dor nessas condições. De maneira interessante estudos mostram que o sistema dinorfina/kappa opioide pode trazer efeitos benéficos no tratamento de transtornos de ansiedade (HANG et al., 2015).

Baseado no exposto, é extremamente importante avaliar o efeito de fármacos que atuam nos receptores kappa opioides (KOR) em dores orofaciais agudas e crônicas, além de estudar a relação da dor neuropática trigeminal com transtornos de ansiedade e o potencial do tratamento de ambas as condições.

## 2 JUSTIFICATIVA

Os KOR desempenham um papel essencial no processamento nociceptivo, estando presentes em diversas estruturas das vias ascendentes e descendentes da dor, como córtex pré-frontal, córtex cingulado anterior, córtex somatosensorial, ínsula, tálamo, amígdala, núcleo accumbens, núcleo parabraqueal e substância cinzenta periaquedutal (CAHILL et al., 2014; MANSOUR et al., 1994; MINAMI et al., 1993). O aumento da expressão desses receptores e de dinorfinas foi demonstrado em modelos de dor crônica (LIU et al., 2019; PODVIN; YAKSH; HOOK, 2016). Estudos não clínicos demonstram efeitos pró-nociceptivos e antinociceptivos de drogas que atuam no sistema kappa opioide como a dinorfina A, dinorfina B, agonistas de KOR como o U50,488 e antagonistas de KOR como o nor-BNI (AITA et al., 2010; BEREITER, 2001; BROADBEAR et al., 1994; NATION et al., 2018; PODVIN; YAKSH; HOOK, 2016; XIE et al., 2017; XU, 2004), incluindo alguns estudos de dores crônicas orofaciais (AITA et al., 2010; NATION et al., 2018; XIE et al., 2017). No entanto, os resultados dependem da via de administração utilizada, seletividade pelos receptores, espécie e sexo do animal testado, bem como do modelo animal (PODVIN; YAKSH; HOOK, 2016; RASAKHAM; LIU-CHEN, 2011).

Dados mais recentes chamaram atenção por verificar que o antagonista de KOR, o nor-BNI, promoveu efeito antinociceptivo em um modelo de migrânea por abuso de medicação (XIE et al., 2017), preveniu a perda do controle inibitório nocivo difuso (DNIC) em modelo de dor cefálica, um fator preditivo para o desenvolvimento de dor crônica (NATION et al., 2018) e foi capaz de prevenir e reverter o desenvolvimento de hiperalgesia crônica induzida pela injeção de prostaglandina E2 na pata (VERGARA et al., 2020).

A interação entre ansiedade e dor crônica já foi verificada em estudos clínicos e não clínicos, demonstrando estruturas em comum entre essas doenças, como o córtex cingulado anterior, a amígdala, entre outras. Técnicas que reduzem a ansiedade, promovem a redução da dor crônica e diversos transtornos de ansiedade foram relacionados com o aumento da dor neuropática. Ademais, modelos animais de dor, inclusive do nosso grupo em modelos de dor orofacial verificaram a presença de comportamento tipo-ansioso (ARAYA et al., 2020; GAMBETA et al., 2016, 2017, 2018; ZHUO, 2016). Baseado nesses estudos, os antagonistas dos KOR podem apresentar um papel importante tanto na mediação e/ou modulação da dor quanto da ansiedade

associada. No presente estudo foi testada a hipótese do nor-BNI demonstrar efeito antinociceptivo em modelos de dor orofacial e efeito do tipo ansiolítico no modelo de dor neuropática trigeminal. Ademais foram investigados possíveis sítios de ação, periféricos e centrais, para o efeito analgésico e ansiolítico do nor-BNI.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a influência do antagonista kappa-opioide (nor-BNI) no comportamento nociceptivo e do tipo-ansioso em modelos animais de dor orofacial

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito do nor-BNI, administrado na mucosa intraoral, na hiperalgesia mecânica e ao calor no modelo animal de dor orofacial pós-operatória;
- Avaliar possíveis sítios de ação do nor-BNI (periféricos e centrais)
- Avaliar o efeito do nor-BNI, administrado no gânglio do trigêmeo, na hiperalgesia mecânica e comportamento tipo-ansioso em modelo animal de neuralgia do trigêmeo em ratos;
- Avaliar o efeito do nor-BNI, administrado no subnúcleo *caudalis*, na hiperalgesia mecânica e comportamento tipo-ansioso, em modelo animal de neuralgia do trigêmeo em ratos;
- Avaliar o efeito do nor-BNI, administrado na amígdala central direita, na hiperalgesia mecânica e comportamento tipo-ansioso, em modelo animal de neuralgia do trigêmeo em ratos;
- Avaliar o efeito do nor-BNI, administrado por via intraperitoneal, na hiperalgesia mecânica e comportamento tipo-ansioso, em modelo animal de neuralgia do trigêmeo em ratos.

## 4 REVISÃO DE LITERATURA

### 4.1 DORES OROFACIAIS

A dor orofacial é um termo que aborda diversas condições que afetam a cabeça, a face e as regiões orais e do pescoço, as quais podem ter origens muscoesqueléticas, vasculares, neurovasculares, neuropáticas, idiopáticas e psicogênicas (SHAEFER; KHAWAJA; BAVIA, 2018).

De acordo com a primeira edição da Classificação Internacional de Dor Orofacial (ICOP), as dores orofaciais são classificados como: dor atribuída a distúrbios de estruturas dento-alveolares e relacionadas anatomicamente, dor miofascial, dor atribuída a lesão ou doença dos nervos cranianos, dor assemelhando-se a apresentações de dores de cabeça primárias e dor orofacial idiopática (ICOP, 1ST EDITION; 2020). Estímulos nocivos presentes na região craniofacial são detectados pelo nervo do trigêmeo o qual transmite informações nociceptivas para o sistema nervoso central (SNC) (RODRIGUEZ et al., 2017). O nervo trigêmeo é o quinto e maior par de nervos cranianos, o qual se divide em três ramos: oftálmico, o mandibular e maxilar, que juntamente com suas ramificações, são responsáveis pela inervação somatossensorial da face e da cabeça (BAJWA et al., 2016), incluindo estruturas intra- e extraorais tais como dentes, cavidade oral e nasal, bem como pela inervação dos músculos da mastigação (JOO et al., 2014). Os corpos celulares dos neurônios trigeminais estão principalmente localizados no TG (MARFURT, 1981). Esses neurônios possuem componentes sensoriais e motores (BATHLA; HEGDE, 2013) e fazem projeções centrais que terminam nos núcleos do complexo sensorial do trigêmeo, onde se encontra o subnúcleo *caudalis* (SC) que constitui o principal sítio de processamento da informação nociceptiva proveniente da região orofacial (SESSLE, 2000).

Entre os tipos mais prevalentes de dor, estão as dores que afetam regiões inervadas pelo nervo do trigêmeo (LEVY et al., 2018). Estima-se que aproximadamente 10-26% da população adulta é acometida por dores na região oral e maxillofacial (SHAEFER; KHAWAJA; BAVIA, 2018), sendo que cerca de 7-11% são dores crônicas (BENOLIEL; SHARAV, 2010).

A característica multidimensional da dor é particularmente importante na região orofacial, visto que a face e a boca têm um valor biológico, emocional e psicológico

para cada indivíduo (SESSLE, 2005). Relata-se que dores orofaciais são mais severas, possuem uma percepção de dor diferente e promovem mais medo relacionado à dor do que outros tipos de dores (RODRIGUEZ et al., 2017). Um estudo clínico mostrou que estímulos na face promovem mais sensibilização do que estímulos aplicados no braço (SCHMIDT et al., 2015). Uma das hipóteses levantadas para elucidar essas diferenças entre dores orofaciais e de outras regiões foi descrita por Rodriguez et al. (2017) que caracterizou uma via direta monossináptica que faz a conexão do TG diretamente para o núcleo parabraqueal, que é um componente essencial no circuito afetivo da dor (RODRIGUEZ et al., 2017). Ademais, na clínica foi demonstrado que existe um controle inibitório da dor menos eficiente em áreas inervadas pelo sistema trigeminal comparado a outras partes do corpo (LEVY, 2018)

#### 4.2 DOR PÓS OPERATÓRIA

A cirurgia é uma das principais causas de síndromes de dor aguda a crônica (PAK et al., 2018). Mais de 320 milhões de pessoas são submetidas a cirurgias a cada ano (GLARE; AUBREY; MYLES, 2019) sendo que cerca de 80% dos pacientes apresentam dor aguda pós-operatória e a prevalência de dor pós-cirúrgica crônica é de aproximadamente 10% (APFELBAUM et al., 2003; GLARE; AUBREY; MYLES, 2019).

A dor aguda é resultado da estimulação nociva de dano tecidual que associado à cirurgia pode resultar em estados inflamatórios persistentes que facilitam a sensibilização periférica e central (GLARE; AUBREY; MYLES, 2019; PAK et al., 2018). Estudos sugerem que a dor induzida por incisão de tecidos possui mecanismos diferentes de outros estados de dor inflamatória ou neuropática. Acredita-se que a hiperalgesia na região da incisão seja mediada pela sensibilização de fibras A $\delta$  e C e na conversão de fibras A $\delta$  mecânicas silenciosas em fibras sensíveis à estímulos mecânicos após a incisão. Além disso, a sensibilização neuronal central provavelmente contribui para a dor pós-operatória e para a hiperalgesia (WU; RAJA, 2011).

Lesões agudas repetidas, hiperalgesia induzida por opioides, neuroinflamação, comorbidades com doenças psiquiátricas, modificação dos sistemas de processamento da dor e maior duração do tempo da cirurgia têm sido associados ao desenvolvimento de estados de dor crônica (PAK et al., 2018).



Ademais, a presença e a intensidade da dor aguda durante ou após a cirurgia são preditivas do desenvolvimento de dor crônica (GAN, 2017).

O manejo clínico da dor pós-cirúrgica é feito com opioides convencionais, tais como morfina, hidrocodona e fentanil, considerados os "padrões ouro" no tratamento. Este manejo, infelizmente, ainda é muito falho (POGATZKI-ZAHN; SEGELCKE; ZAHN, 2018). Assim, a ineficácia no tratamento da dor pós-operatória está associado a maior morbidade, mortalidade, prejuízo funcional e da qualidade de vida, retardo no tempo de recuperação, duração prolongada do uso de opioides, maior custo dos cuidados de saúde e pode levar ao desenvolvimento de dor crônica e da doença Dependência de opioides (APFELBAUM et al., 2003; GAN, 2017; GLARE; AUBREY; MYLES, 2019; PAK et al., 2018). É válido mencionar que a prescrição de opioides no Brasil apresentou um aumento de 465% nos últimos 6 anos (KRAWCZYK et al., 2018). Dessa forma, o uso de opioides nesses pacientes é complexo, sendo necessário equilibrar o tratamento para obter o controle da dor aguda no período pós-operatório imediato e ao mesmo tempo reduzir os riscos do uso crônico persistente de opioides (GLARE; AUBREY; MYLES, 2019).

Muito progresso tem sido feito no reconhecimento da dor após a cirurgia como um importante problema de saúde pública, na investigação de mecanismos associados, fatores de risco e nas abordagens de gerenciamento da dor. No entanto, existem poucos estudos disponíveis sobre intervenções que possam prevenir ou minimizar esta complicação cirúrgica comum, e a dor pós-operatória inadequadamente controlada continua a ser um desafio clínico (GAN, 2017; PAK et al., 2018). Deste modo, encontrar maneiras de minimizar todos os riscos associados a essa dor, através da identificação de novos alvos terapêuticos e mecanismos envolvidos nesse tipo de dor é de particular interesse para a população (GLARE; AUBREY; MYLES, 2019)

#### 4.2.1 MODELO DE DOR PÓS OPERATÓRIA

A maioria dos estudos sobre dor pós-operatória utiliza o modelo de incisão na pata, o qual permitiu o estudo dos tratamentos e mecanismos envolvidos nessa condição (POGATZKI-ZAHN; SEGELCKE; SCHUG, 2017). No entanto, devido às diferenças no processamento da dor de origem orofacial se comparado com outros locais do corpo, modelos de dor pós-operatória orofacial foram desenvolvidos, como

o modelo de Urata et al (2015). Neste modelo foi detectado a presença de hiperalgesia mecânica, térmica ao calor e ao frio, que persiste por aproximadamente 3 a 7 dias (URATA et al., 2015). Utilizando a mesma metodologia, um estudo do nosso grupo também verificou hiperalgesia térmica e mecânica nos animais 1-3 dias e de 1-5 dias, respectivamente (ARAYA et al., 2020). Esse modelo também foi utilizado em alguns estudos para a investigação de alvos terapêuticos e mecanismos envolvidos na dor pós-operatória (ARAYA et al., 2017, 2020; IKUTAME et al., 2020; URATA et al., 2018). Dessa forma, o modelo de incisão da mucosa oral pode ser considerado uma ferramenta importante para o entendimento dos mecanismos e para a investigação de drogas com potencial terapêutico para a dor aguda orofacial.

#### 4.2.2 DOR NEUROPÁTICA

A dor crônica é um motivo frequente para a procura de atendimento médico no mundo (JOHANNES et al., 2010). A dor neuropática é um tipo de dor crônica causada por uma lesão ou doença do sistema somatossensorial, o qual é responsável pela percepção de estímulos como o toque, pressão, dor, temperatura, posição, movimento e vibração. Esses estímulos são percebidos pelos nervos somatossensoriais presentes na pele, músculos, juntas e fáscia transmitindo a informação para a medula espinhal e, posteriormente, para o cérebro. No estado de dor crônica existe uma alteração ou disfunção dessa transmissão sensorial desde os aferentes primários até estruturas cerebrais superiores (COLLOCA et al., 2017).

Estima-se que a dor crônica com características neuropáticas acometa cerca de 7 a 10% da população (VAN HECKE et al., 2014). No entanto, essa estimativa é dificultada pela escassez de critérios para diagnóstico. Várias doenças e condições podem levar ao desenvolvimento da dor neuropática, dentre as mais comuns estão o diabetes, quimioterapia, infecções virais, traumas e amputações. A dor neuropática desencadeia uma série de sintomas como sensações de queimação, choque elétrico e dor causada por estímulos previamente não dolorosos (toque leve) que, frequentemente, levam ao desenvolvimento de comorbidades como a ansiedade, distúrbios do sono e depressão. Todos esses fatores contribuem para uma piora significativa da qualidade de vida desses pacientes (COLLOCA et al., 2017).

#### 4.2.3 NEURALGIA DO TRIGÊMEO

Uma das formas mais comuns de dor craniofacial em adultos é a neuralgia do trigêmeo, que é considerada uma das formas mais severas de dor (HAYES et al., 2017). É caracterizada como uma dor paroxística, i.e. dor súbita, geralmente unilateral, severa, de curta duração (segundos até 2 minutos), com episódios de dor recorrentes que acometem um ou mais das ramificações do nervo do trigêmeo, principalmente a mandibular e maxilar e que comumente ocorrem no lado direito da face (ARAYA et al., 2019; MCMILLAN, 2011; STEFANO et al., 2017). Os episódios de ataques paroxísticos de dor característicos da neuralgia do trigêmeo podem ocorrer várias vezes ao dia e segundo estudos clínicos a maioria dos pacientes apresentam de 10 a 50 ataques por dia (ARAYA et al., 2019). Esses episódios podem perdurar por semanas a meses, os quais, posteriormente podem evoluir para remissão espontânea, que pode durar meses ou anos. São desencadeados por estímulos mecânicos inócuos como o movimento muscular ou o toque nas zonas gatilho, que se encontram mais frequentemente na área nasal e perioral, restringindo atividades cotidianas como mastigar, escovar os dentes, lavar o rosto, se barbear, falar ou tocar a área afetada (ARAYA et al., 2019; BAJWA et al., 2016; SPINA et al., 2017). Com o passar do tempo, os ataques ocorrem mais frequentemente e a dor se torna mais duradoura (LOVE; COAKHAM, 2001).

Existem poucos estudos sobre a prevalência da neuralgia do trigêmeo na população, no entanto estima-se que seja entre 0,03 a 0,3%. A incidência é maior em mulheres do que em homens (na proporção de 3:1) e em 90% dos casos os sintomas começam com 40 anos de idade, sendo que a faixa etária mais afetada é de pessoas acima de 60 anos de idade (DE TOLEDO et al., 2016; ROZEN, 2004). Sugere-se que a principal causa da neuralgia do trigêmeo é a compressão da raiz do nervo do trigêmeo, geralmente pela artéria cerebelar superior, que pode levar ao desenvolvimento de desordem desmielinizante focal primária, alterações estruturais dos neurônios como atrofia ou hipertrofia dos axônios, hiperexcitabilidade e susceptibilidade de excitação cruzada de neurônios próximos (ARAYA et al., 2019; LOVE; COAKHAM, 2001). Outro achado em estudos não clínicos são alterações em canais de sódio voltagem dependente (Nav) que poderiam explicar a excitabilidade neuronal e disparo ectópico de fibras trigeminais aferentes em ataques paroxísticos (ARAYA et al., 2019).

Os tratamentos de primeira linha para a neuralgia do trigêmeo são com as drogas carbamazepina e oxcarbamazepina, mas seus efeitos adversos prejudicam a adesão e a continuidade do tratamento (DI STEFANO; TRUINI, 2017). A carbamazepina promove efeito analgésico em 70% dos pacientes tratados e, nesses pacientes, reduz a dor em aproximadamente 50% (WIFFEN et al., 2011).. O principal mecanismo de ação responsável pelo seu efeito analgésico condiz com a fisiopatologia da doença, como citado anteriormente. A carbamazepina bloqueia os canais de sódio nas membranas neuronais quando se tem estímulos de alta frequência, impedindo a propagação de sinal e da atividade ectópica. Infelizmente, o uso prolongado desse medicamento está relacionado com diversos efeitos adversos como sonolência, cansaço, tontura, náusea, vômito, ataxia, toxicidade renal e hepática, reações alérgicas, recidiva dos sintomas em até 50% dos pacientes e seu uso foi relacionado várias com reações de hipersensibilidade. Além disso, a carbamazepina é indutora de várias isoenzimas da superfamília citocromo P450 (CYP) o que resulta em aumento do seu próprio metabolismo e necessidade de aumentos frequentes da dosagem (SPINA; PISANI; PERUCCA, 1996). Razões pelas quais frequentemente resultam na descontinuação do uso da carbamazepina. A oxcarbamazepina não possui estudos suficientes para comprovar sua eficácia devido à dificuldade em realizar testes clínicos numa doença rara como a neuralgia do trigêmeo. No entanto, acredita-se que possua eficácia similar à carbamazepina além de ser mais segura e com perfil farmacocinético melhor (ARAYA et al., 2019).

A carbamazepina ou oxcarbamazepina também podem ser substituídas ou combinadas com anticonvulsivantes como a pregabalina, gabapentina e topiramato e/ou baclofeno (GAMBETA; CHICHORRO; ZAMPONI, 2020). Os tratamentos usuais para dor neuropática, tais como com os antidepressivos, não estão indicados para o tratamento da neuralgia do trigêmeo (GAMBETA; CHICHORRO; ZAMPONI, 2020), possivelmente devido a particularidades do sistema sensorial trigeminal, para revisão ver Sessle (2000). Nesse sentido, recentemente foi descrita uma via monossináptica que faz a conexão do TG diretamente para o núcleo parabraqueal, o qual possui conexões com estruturas cerebrais límbicas como o núcleo central da amígdala, núcleo leito da estria terminal, hipotálamo lateral, córtex anterior cingulado e insular, que são estruturas envolvidas no processamento emocional, sugerindo um mecanismo pelo qual as dores orofaciais apresentam uma carga emocional maior (RODRIGUEZ et al., 2017).

Esses achados podem contribuir para o entendimento da relação das dores orofaciais com transtornos emocionais, principalmente depressão e a ansiedade, que no caso da neuralgia do trigêmeo afetam cerca de 30-50% dos pacientes que sofrem dessa condição (MELEK et al., 2019; MELEK; DEVINE; RENTON, 2018; ZAKRZEWSKA et al., 2017).

#### 4.2.3.1 MODELO DE DOR NEUROPÁTICA OROFACIAL

Baseado no modelo proposto por Vos e colaboradores (1994), Chichorro e colaboradores (2006) propuseram um modelo de dor orofacial crônica de origem neuropática como modelo de neuralgia do trigêmeo, o qual reproduz características dessa condição, tais como hiperalgesia térmica e mecânica (CHICHORRO et al., 2006, 2009; CHICHORRO; ZAMPRONIO; RAE, 2006a; YOUNIS et al., 2016). Nesse modelo, é realizada a constrição crônica do nervo infraorbital (CION) dos animais através de uma cirurgia na face. Em outro modelo de dor trigeminal orofacial, o qual utilizou a lesão por constrição crônica do nervo infraorbital (IoN-CCI), através de uma cirurgia intraoral, e no modelo desenvolvido por Chichorro e colaboradores (2006), além dos comportamentos nociceptivos, foram verificados a presença de comportamento tipo-ansioso nos animais (GAMBETA et al., 2018; WANG et al., 2015b). Portanto, o CION pode ser considerado um modelo relevante para o estudo da busca de novos alvos terapêuticos para o controle da dor e ansiedade associada à doença.

#### 4.3 RELAÇÃO ENTRE DOR CRÔNICA E ANSIEDADE

Por muito tempo, a dor foi considerada somente pelo aspecto unilateral, onde o nível de dano correspondia à magnitude da dor. Posteriormente, os aspectos multidimensionais da dor começaram a ser estudados, considerando aspectos cognitivos, afetivos e sensoriais (GATCHEL et al., 2007). Desde então surgiram vários estudos relacionando a dor crônica com transtornos emocionais, tais como depressão e ansiedade (YALCIN; BARROT, 2014). Em condições de dor neuropática, tem sido reportada uma prevalência de cerca de 30% de transtornos emocionais, principalmente depressão e ansiedade (YALCIN; BARROT, 2014). Ademais, pacientes com dor crônica apresentam altos níveis de ansiedade relacionada com a

dor, definida como a preocupação das consequências negativas da dor, a qual já foi relacionada com experiências de dor mais incapacitantes (ROGERS et al., 2019).

Existem diversas estruturas cerebrais em comum que estão envolvidas nessas comorbidades, das quais se destacam o córtex pré-frontal ventromedial, córtex insular, a amígdala e o córtex cingulado anterior (KOGA et al., 2015; ZHANG; CLINE; GILBERT, 2014; ZHUO, 2016). Os mecanismos envolvidos nessa inter-relação estão começando a ser elucidados, mas é relevante mencionar que medicamentos como o anticonvulsivante pregabalina e antidepressivos inibidores da receptação de serotonina-noradrenalina apresentam tanto efeitos analgésicos, como ansiolíticos (COLLOCA et al., 2017; CRASKE et al., 2017; FRAMPTON; FOSTER, 2006; MULA; PINI; CASSANO, 2007; SCHERDER; PLOOIJ, 2012; WALLACE et al., 2008). A amígdala é uma estrutura cerebral importante para a modulação tanto das emoções no geral, como na dimensão afetivo-emocional da dor. A amígdala tem um papel importante em atribuir significado afetivo aos estímulos ambientais, formando uma ligação entre as regiões do cérebro que processam as informações sensoriais e as áreas envolvidas na produção de respostas emocionais. Mais especificamente em relação à dor, uma série de estudos clínicos e não clínicos indicaram que a amígdala, juntamente com o córtex cingulado anterior, desempenha um papel crítico no processamento de componentes afetivos da dor (CAHILL et al., 2014; NEUGEBAUER, 2015). Recentemente, um novo mecanismo foi proposto para a ansiedade induzida pela dor, envolvendo neurônios do núcleo talâmico paraventricular e do córtex pré-frontal ventromedial (LIANG et al., 2020).

Ademais, corroborando as observações clínicas que associam a dor com a ansiedade, o comportamento do tipo-ansioso também tem sido observado em modelos animais de dor crônica, levando cerca de 2 a 4 semanas desde a indução da dor até o desenvolvimento do comportamento tipo-ansioso nos animais (GAMBETA et al., 2018; NARITA et al., 2006; ROESKA et al., 2009; YALCIN et al., 2011). Com relação à dor orofacial, estudos não clínicos de dor do tipo neuropática, inflamatória e dor associada ao câncer observaram um aumento no comportamento tipo-ansioso nos animais (ARAYA et al., 2020; BAHAADDINI et al., 2016; GAMBETA et al., 2016, 2017; HANG et al., 2015; RAOOF et al., 2016; SHANG et al., 2015). Além disso, no modelo proposto por Chichorro e colaboradores (2006) somente os animais hiperalgésicos apresentam comportamento tipo-ansioso 15 dias após a cirurgia da CION, demonstrando mais uma vez a associação da dor com a ansiedade e sugerindo que



a ansiedade se desenvolve em decorrência do quadro doloroso (GAMBETA et al., 2018).

#### 4.4 SISTEMA KAPPA OPIOIDE

As endorfinas, encefalinas e as dinorfinas pertencem ao grupo dos opioides endógenos, os quais se ligam aos receptores opioides ( $\mu$ , delta e kappa, respectivamente). Esses receptores estão envolvidos na regulação da dor, e, portanto, são alvos para o tratamento da mesma (LAI et al., 2006). Os agonistas de receptor  $\mu$  opioides, como a morfina, são os mais utilizados por serem potentes analgésicos, porém acompanham alguns efeitos indesejados como depressão respiratória, sedação, náusea e constipação. Além disso, pode levar ao desenvolvimento de tolerância e transtorno por uso de substâncias (DSM-5), dificultando seu uso como tratamento prolongado na clínica (COLLOCA et al., 2017; KHADEMI et al., 2016; PATWARDHAN et al., 2018). Portanto, o estudo de receptores que não promovem esses efeitos adversos, como o KOR, é de grande importância (BOOM et al., 2012; TRANG et al., 2015).

Os KORs regulam sistemas monoaminérgicos, funções dopaminérgicas mesolímbicas, canais iônicos e a transmissão de neurônios glutamatérgicos, gabaérgicos e noradrenérgicos (BRUIJNZEEL, 2009; FERRÉ et al., 2019). Da mesma forma controlam o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) e, conseqüentemente estão envolvidos em fenômenos relacionados com o estresse com implicações na adição, depressão e ansiedade (FERRÉ et al., 2019).

Além disso, esses receptores estão expressos em diversas áreas do cérebro envolvidas na neurocircuitaria da dor (córtex pré-frontal, córtex cingulado anterior, córtex somatosensorial, ínsula, tálamo, amígdala, núcleo accumbens, núcleo parabraquial, substância cinzenta periaquedutal) e da ansiedade (amígdala basolateral e central, hipocampo e córtex pré-frontal) (CAHILL et al., 2014; MANSOUR et al., 1994; MINAMI et al., 1993).

Os receptores kappa opioides atuam por dois mecanismos: um dependente de proteína G e outro independente. No primeiro mecanismo, a ativação dos receptores que estão acoplados a proteína  $G_i/o$ , levam a inibição da adenilil ciclase através da subunidade  $G\alpha$  e induz o aumento da condutância dos canais de potássio e redução dos canais de cálcio por meio da subunidade  $G\beta\gamma$ , hiperpolarizando a

membrana. Esse processo culmina em uma redução da geração de potenciais de ação e na liberação de neurotransmissores nos neurônios. Quando ocorre uma ativação desses receptores por um período prolongado, os KORs são dessensibilizados por sua fosforilação e recrutamento das  $\beta$ -arrestinas e, também, por endocitose. Posteriormente, são internalizados e podem retornar à membrana por desfosforilação após serem reciclados ou são degradados por mecanismos intracelulares (CAHILL et al., 2014; MERCADANTE; ROMUALDI, 2019).

Diante das evidências da expressão e da função desses receptores, eles se tornaram alvo de diversos estudos. Estudos em modelos experimentais de dor crônica começaram a reportar um aumento de dinorfina A, um ligante endógeno dos receptores kappa, na medula espinhal, que persiste por meses após a indução do modelo de dor (MALAN et al., 2000; RUDA et al., 1988; SCHWEI et al., 1999; VANDERAH et al., 2000), e um aumento da expressão de dinorfinas no gânglio da raiz dorsal, uma estrutura-chave no processamento nociceptivo (MIKA et al., 2010). Da mesma forma, foi demonstrado que a administração de dinorfinas em animais naive promove alodinia por mais de 45 dias (VANDERAH et al., 1996). Posteriormente, foi estudado o papel da dinorfina utilizando animais knockout para o gene pró-dinorfina que mesmo após lesão do nervo, apresentam ausência de comportamentos nociceptivos (PODVIN; YAKSH; HOOK, 2016). De acordo com esses e outros resultados, foi demonstrado o importante papel dos receptores kappa opioides na neurocircuitaria da dor (PODVIN; YAKSH; HOOK, 2016).

Estudos com antagonistas de KOR demonstraram efeitos antinociceptivos em modelos de dores orofaciais (NATION et al., 2018; XIE et al., 2017), a redução da aversão no teste do CPP na dor tônica (NAVRATILOVA et al., 2019a), a reversão da perda do DNIC, um fator importante para a cronificação da dor (NATION et al., 2018; PHELPS et al., 2019) e parecem contribuir para o componente negativo da dor (MASSALY et al., 2019). No entanto, num modelo dor utilizando a injeção de formalina na pata, não foram capazes de alterar o limiar mecânico (WETTSTEIN; GROUHEL, 1996). Possivelmente os efeitos desses fármacos na nocicepção dependam da natureza, localização e intensidade do estímulo empregado (WETTSTEIN; GROUHEL, 1996).

Além disso, o perfil ansiolítico de antagonistas de KOR já foi extensivamente documentado na literatura (BRUCHAS et al., 2007; JACKSON et al., 2010; KNOLL et al., 2007, 2011; PETERS et al., 2011; ROGALA et al., 2012; SCHANK et al., 2012),

incluindo em modelos de medo condicionado e ansiedade (MCLAUGHLIN; MARTON-POPOVICI; CHAVKIN, 2003; NEWTON et al., 2002; SHIRAYAMA et al., 2004), sendo que, uma das vantagens dessas drogas, é que apresentam atividade ansiolítica aguda, diferentemente de outros tratamentos clássicos como os antidepressivos (CARLEZON; KRYSTAL, 2016).

Diante dessas evidências, o KOR pode ser um potencial alvo para o tratamento de dores orofaciais e principais comorbidades associadas, como a ansiedade.

#### 4.4.1 NOR-BNI

O nor-BNI é um antagonista seletivo dos receptores kappa opioides. Essa droga possui características bem particulares, é um antagonista relativamente potente, que apresenta o início dos efeitos após 2 horas da sua administração e seu efeito é mantido por semanas (MUNRO et al., 2012a; URBANO et al., 2014). O antagonismo dos KOR nos primeiros 30 minutos é insignificante, aumentando gradualmente até atingir o platô após 2 horas quando administrado pela via subcutânea (MUNRO et al., 2012a; WETTSTEIN; GROUHEL, 1996). Possui alta seletividade para os KOR e o antagonismo do efeito do agonista kappa, U50,488H se mostrou dose-dependente (RUTTEN et al., 2018a). Na dose de 10 mg/kg promoveu antagonismo quase total dos KOR, segundo Rutten e colaboradores (2018). Apresenta uma eliminação bifásica, tendo uma fase rápida (0,75-4 horas) e uma fase lenta (4-48 horas). A taxa de eliminação no soro é mais rápida do que no cérebro (KISHIOKA et al., 2013). Vários mecanismos foram propostos para explicar o efeito prolongado do nor-BNI como por exemplo a ativação da quinase N-terminal c-Jun 1, cascata de proteína quinase ativada por mitogênio e, em consequência, inibição da sinalização no receptor kappa, e a presença de longo prazo do composto (norBNI) no sistema nervoso central de ratos possivelmente através da sua entrada e retenção nos lisossomos (BRUCHAS et al., 2007; KISHIOKA et al., 2013; MUNRO et al., 2012b). Essa droga não é utilizada na clínica devido a seu efeito prolongado que dificulta estudos clínicos e apresenta um risco no caso de efeitos adversos graves (RUTTEN et al., 2018b; URBANO et al., 2014).

## 5 MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 ANIMAIS

Foram utilizados ratos Wistar machos, pesando entre 180-220 g, da mesma linhagem, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Paraná (UFPR). Os animais foram mantidos em uma sala com umidade e temperatura controladas ( $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ), em um ciclo de claro-escuro de 12 horas (7 h-19 h). Água e comida foram fornecidas à vontade aos animais durante todos os experimentos. Os animais foram ambientados no laboratório por, no mínimo, 48 horas antes do início dos experimentos. Os testes experimentais foram realizados em salas silenciosas com temperatura e umidade controladas, durante a fase clara do ciclo dos animais. Todos os protocolos utilizados neste estudo foram aprovados pela Comissão de Ética para o Uso de Animais do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (CEUA/BIO – UFPR, autorização #1198).

### 5.2 DROGAS, REAGENTES E SOLUÇÕES

- Água para injeção (Cristália, São Paulo, SP, Brasil)
- Acrílico autopolimerizante líquido (Jet Acrílico autopolimerizante®, Clássico Artigos Odontológicos Indústria Brasileira, Campo Limpo Paulista, SP, Brasil);
- Azul de toluidina (Labsynth, Diadema, SP, Brasil);
- Cloridrato de Quetamina (Quetamina®, Vetnil Indústria e Comércio de Produtos Veterinários Ltda., Louveira, SP, Brasil) - 50 mg/kg, via i.p;
- Cloridrato de Xilazina (Xilasin®, Syntec Tecnologia Farmacêutica Aplicada à Medicina Veterinária, Santana de Parnaíba, SP, Brasil) - 10 mg/kg, via i.p;
- Halotano (Cristália, Itapira, SP, Brasil);
- Norbinaltorfimina (nor-BNI) (Tocris®, Bristol, Reino Unido) diluído em água para injeção;
- Peróxido de Hidrogênio (Água oxigenada – Solução de Peróxido de Hidrogênio 3%, Rioquímica Indústria Farmacêutica, São José do Rio Preto, SP, Brasil);

- Resina acrílica autopolimerizante pó (Jet Acrílico autopolimerizante®, Clássico Artigos Odontológicos Indústria Brasileira, Campo Limpo Paulista, SP, Brasil);

### 5.3 MÉTODOS DE ADMINISTRAÇÃO DE DROGAS

#### 5.3.1 Injeção na mucosa oral

A injeção na mucosa oral foi realizada de acordo a publicação do nosso grupo (ARAYA et al., 2020). Primeiramente, os animais foram anestesiados com halotano (4%), posicionados lateralmente na mesa e mantidos com a boca aberta com o auxílio de materiais cirúrgicos. Em seguida, o nor-BNI (2,5 µg, 50 µL) (NATION et al., 2018; NAVRATILOVA et al., 2019a) ou veículo (50 µL) foram administrados na mucosa oral direita com uma agulha de calibre 31G.

#### 5.3.2 Injeção intraganglionar

Esse procedimento foi realizado de acordo com Neubert e colaboradores (2005) com pequenas modificações (ARAYA et al., 2017, 2020). Os animais foram submetidos à anestesia com halotano a 4% e posicionados ventralmente. Em seguida, uma agulha de calibre 27G conectada à uma seringa Hamilton de 25 µL por um cateter de polietileno, contendo nor-BNI (2,5 µg/10 µL) (NATION et al., 2018; NAVRATILOVA et al., 2019a) ou veículo (10 µL) foi utilizada para realizar a injeção intraganglionar. A agulha foi posicionada com um ângulo de aproximadamente 10° relativo à linha média da cabeça e introduzida pelo canal infraorbital e, posteriormente, através do forame redondo até atingir o TG. Por fim, a agulha foi cuidadosamente removida e os animais foram monitorados até a recuperação da anestesia

#### 5.3.3 Injeção medular subaracnóide

A injeção medular subaracnóide foi realizada de acordo com Fischer e colaboradores (2005) com os animais sob anestesia (halotano a 4%) e monitorados até completa recuperação. Os animais foram posicionados dorsalmente e realizou-se uma tricotomia da pele na região cervical superior. Uma agulha de calibre 30G

conectada a uma seringa Hamilton de 25  $\mu$ L por um cateter de polietileno foi inserida cerca de 4 mm abaixo do osso occipital com uma pequena inclinação na direção craniana. Posteriormente, introduziu-se a agulha por mais 2 mm para perfurar a membrana atlanto-occipital e atingir o espaço subaracnóideo medular. Essa técnica permite a administração de drogas no fluído cérebro-espinhal ao redor do SC. Então, o nor-BNI (3  $\mu$ g, 10  $\mu$ L) ou veículo (10  $\mu$ L) foi injetado na taxa de 20  $\mu$ L/min (ARAYA et al., 2017).

#### 5.3.4 Injeção intra-amigdalar

Os animais foram submetidos à cirurgia estereotóxica para a implantação das cânulas no núcleo CeA (hemisfério direito), para posteriormente realizar a infusão com o nor-BNI. Os animais foram anestesiados com quetamina (50 mg/kg) e xilasina (10 mg/kg) e implantou-se uma cânula-guia nas seguintes coordenadas: CeA ( $\pm$ 4.0 mm mediolateral, -2.0 mm anteroposterior, e 6.0 mm dorsoventral a partir do bregma) (NATION et al., 2018). As cânulas foram implantadas e afixadas no crânio com quatro parafusos cranianos e resina acrílica autopolimerizável e um mandril de aço inoxidável foi colocado em cada uma das cânulas-guia para evitar seu entupimento. Ao término do procedimento, os animais foram retirados do aparelho estereotático, mantidos em local aquecido e acompanhados até completa recuperação. Os testes comportamentais foram iniciados com, no mínimo, 7 dias de intervalo após a cirurgia (NONES et al., 2017).

Para a realização das infusões os animais foram contidos, usando um pano para envolvê-los e receberam o tratamento com nor-BNI (2,5  $\mu$ g em 0,5  $\mu$ L) ou veículo (0,5  $\mu$ L) (NATION et al., 2018). A injeção foi realizada com o auxílio de uma cânula injetora dupla de 33G (Plastics One Inc, Roanoke, VA, EUA), com comprimento adicional de 1 mm em relação ao comprimento das cânulas para garantir o acesso da droga no núcleo CeA. O injetor foi acoplado, com auxílio de um cateter de polietileno, a uma seringa (Hamilton, 25  $\mu$ L) e a mesma conectada a um injetor (Stoelting Co, Wood Dale, IL, EUA), o qual foi programado para dispensar a solução com fluxo de 0,5  $\mu$ L/min. Após a injeção, o injetor permaneceu acoplado às cânulas por 1 min adicional, a fim de prevenir o refluxo da mesma pela cânula e, na sequência, foi lentamente removido (NATION et al., 2018; NONES et al., 2017).

Após o término de todos os experimentos comportamentais, o sítio de administração foi confirmado. Os animais foram anestesiados, perfundidos e foi realizada a injeção de azul de metileno na cânula implantada no núcleo CeA. Posteriormente, foram realizados cortes de 50  $\mu$ m do cérebro para determinar a localização do corante (GEAR; LEVINE, 1995). Somente os animais onde o corante estava presente no núcleo CeA foram incluídos nas análises (PAXINOS; WATSON, 2005).

## 5.4 MODELOS DE DOR OROFACIAL

### 5.4.1 Incisão da mucosa oral

Os animais foram submetidos a incisão da mucosa oral de acordo com Urata e colaboradores (2015). Primeiramente, os animais foram anestesiados com cloridrato de quetamina e de xilazina (50 e 10 mg/kg, respectivamente, i.p.). Após o estabelecimento da anestesia, os animais foram posicionados lateralmente e a boca foi mantida aberta com o auxílio de materiais cirúrgicos. Em seguida, foi realizada uma incisão na mucosa oral direita de aproximadamente 10 mm de comprimento por 2 mm de profundidade com ajuda de um bisturi e, posteriormente, foi aplicado um ponto de sutura no meio da incisão, utilizando um fio de seda agulhado 4.0. Os animais do grupo sham receberam a mesma anestesia e foram mantidos durante 1 minuto com a boca aberta na mesma posição dos animais incisão. Ao término da cirurgia os animais foram monitorados em sala aquecida até sua completa recuperação da anestesia.

### 5.4.2 Constrição do nervo infraorbital (CION)

O método de constrição do nervo infraorbital a ser empregado foi desenvolvido por VOS e colaboradores (1994), com algumas modificações (CHICHORRO et al., 2006). Inicialmente os animais foram submetidos a anestesia com uma mistura de quetamina e xilasina via intraperitoneal (50 e 10 mg/kg, respectivamente). Após o estabelecimento da anestesia foi realizada a tricotomia da região direita da face. Em seguida, foi realizada uma incisão na pele, abaixo do olho direito do animal, aproximadamente 3 mm posterior a área de inserção das vibrissas. A parte rostral do nervo infraorbital foi dissecada e colocaram-se duas amarras frouxas

com fio de seda 4.0 ao redor do feixe nervoso com 2 mm de distância. Posteriormente, a sutura da pele foi realizada com o mesmo fio de seda. O grupo sham passou pelo mesmo procedimento; no entanto, não foi realizado as amarras no feixe nervoso, de forma que o feixe foi somente exposto. Após a cirurgia, o estado geral dos animais foi observado até a completa recuperação da anestesia. Os testes comportamentais foram realizados no mínimo 4 dias após a CION.

## 5.5 AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO NOCICEPTIVO

### 5.5.1 Hiperalgisia ao calor

Os animais foram contidos utilizando um pano para envolvê-los e, em seguida uma fonte de calor radiante (50 °C, aproximadamente) foi aproximada da face direita, com o cuidado para não queimar as vibrissas dos ratos, mantendo uma distância de 1 cm da pele. A retirada da cabeça ou movimentos rápidos e consecutivos das vibrissas foram considerados a latência para resposta ao calor. Os animais foram previamente ambientados com o método de contenção para evitar o estresse durante o experimento. Foi utilizado com critério de inclusão os animais que responderam entre 9 e 20 s e um tempo de corte de 20 s foi estabelecido para evitar danos aos tecidos (CHICHORRO et al., 2009).

### 5.5.2 Hiperalgisia mecânica

A hiperalgisia mecânica foi avaliada utilizando filamentos de Von Frey como estímulo mecânico. Primeiramente, os animais foram colocados individualmente em caixas de observação (30 cm<sup>3</sup>) por um período de 2 h para a ambientação. Esse teste consiste na aplicação crescente de 8 filamentos de Von frey (Semmes- Weinstein monofilaments, Stoelting, USA: 0,04; 0,07; 0,16; 0,4; 1,0; 2,0; 4,0 e 8,0 g) na face direita dos animais, próxima à região de inserção das vibrissas, sendo que cada filamento foi aplicado 3 vezes, com um intervalo de 3 segundos entre cada aplicação. O limiar de resposta foi considerado quando o estímulo mecânico do filamento evocou, por duas vezes, comportamentos como retirada rápida da cabeça e reações de ataque/escape (CHICHORRO; ZAMPRONIO; RAE, 2006b). Antes da cirurgia da CION foi realizada uma pré-seleção, onde os animais que apresentaram limiar de



resposta na aplicação de qualquer um dos filamentos até 8 g, foram excluídos dos experimentos. Após 14 dias da cirurgia, foi observada a presença de hiperalgesia, isto é, quando os animais apresentaram uma redução significativa do limiar basal de resposta à estimulação mecânica igual a 8 g. Os animais CION que não apresentaram hiperalgesia, ou seja, que apresentaram limiar mecânico acima de 8 g, foram excluídos dos experimentos. No dia do teste, após a administração do nor-BNI foi avaliado o limiar de resposta aos filamentos de hora em hora, por 5-6 horas e em alguns casos foi realizada uma medida de 24 e 48 horas.

## 5.6 AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO TIPO-ANSIOSO

### 5.6.1 Labirinto em cruz elevado

O teste foi inicialmente descrito por Pellow e colaboradores (PELLOW et al., 1985) sendo um aparato validado para a avaliação do comportamento do tipo-ansioso em ratos e camundongos Walf e Frye (2007). O aparato utilizado é feito de madeira e fica a 50 cm do chão, sendo constituído por 4 braços de madeira de tamanho igual, 2 abertos e 2 fechados e no cruzamento entre os braços há uma área central de 10 cm<sup>2</sup>. Para a realização do teste os animais foram colocados individualmente no centro do aparato por 5 minutos e filmados, sendo que a exposição ao aparato ocorreu somente no dia do teste. Os parâmetros avaliados foram os seguintes: tempo nos braços abertos; tempo nos braços fechados; número de entradas no braço aberto e número de entradas no braço fechado. O número total de entradas foi utilizado como parâmetro de locomoção espontânea, para assegurar que os animais não apresentavam prejuízo locomotor durante os testes comportamentais. Após cada animal ser testado, o aparato foi limpo com uma solução de etanol a 10% para retirar o cheiro e resíduos dos animais colocados no aparato anteriormente (HOGG, 1996; WALF; FRYE, 2007).

### 5.6.2 Transição claro-escuro

O teste foi realizado em um aparato de madeira com dimensões totais de 48x24x27 cm, sendo dividido em dois compartimentos de dimensões iguais (24x24x27 cm). Essa divisão é feita por uma porta (10x10 cm) através da qual os animais podem

atravessar de um compartimento para o outro: um desses compartimentos é pintado de preto, não iluminado; e o outro é pintado de branco e iluminado a 300 lux. Durante o teste, os ratos foram colocados no lado claro com a face voltada para a porta que separa os dois compartimentos. Após a primeira transição para o compartimento escuro da caixa, iniciou-se o registro do comportamento do animal por um período de 5 minutos. Foram quantificados o tempo total gasto no compartimento claro e escuro, sendo que o tempo gasto no compartimento claro é considerado uma medida de comportamento do tipo ansioso. Portanto, maior tempo de permanência no compartimento claro em comparação com os animais do grupo controle, indica menor presença de comportamento tipo-ansioso dos animais. A caixa claro-escuro foi limpa com uma solução de etanol a 10% antes de cada teste comportamental (CRAWLEY; GOODWIN, 1980).

## 5.7 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

Este trabalho foi dividido em duas partes, na primeira parte (correspondente ao experimento 1) foi realizado um estudo preliminar a fim de avaliar se o nor-BNI teria efeitos na nocicepção em modelo de dor orofacial. Para tanto, foi realizado o tratamento com nor-BNI em modelo de incisão da mucosa oral, um modelo de dor aguda pós-operatória orofacial.

Na segunda parte do estudo (correspondente aos experimentos 2 a 5), foi avaliado o efeito do nor-BNI na dor neuropática, utilizando a CION, um modelo para o estudo da neuralgia do trigêmeo. Nesta parte, aprofundamos o estudo dos efeitos do antagonista de KOR investigando seu efeito local, central e sistêmico na nocicepção através da administração do nor-BNI no TG, SC, núcleo CeA e pela via intraperitoneal. Ressaltando o tratamento sistêmico que em termos translacionais é extremamente relevante. Além disso, como os transtornos de ansiedade são comorbidades frequentes na neuralgia do trigêmeo, as administrações de nor-BNI que poderiam afetar estruturas relacionadas na modulação da ansiedade como a injeção no TG, núcleo CeA e intraperitoneal também foi avaliado o comportamento tipo-ansioso dos animais no modelo da CION.

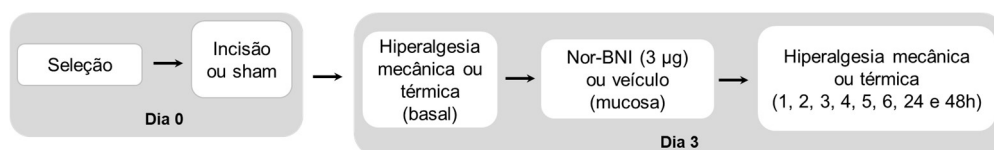
Em cada protocolo experimental foram utilizados grupos independentes de animais e eles foram randomizados através de um método aleatório simples para os grupos de tratamento, de acordo com a hiperalgesia ao calor ou mecânica após a

incisão ou CION. A indução dos modelos de dor orofacial foi realizada após a seleção, através da CION ou incisão.

#### 5.7.1 Experimento 1 – Avaliação temporal do tratamento com nor-BNI na hiperalgesia térmica e mecânica na dor pós operatória

Para investigar o efeito do tratamento com nor-BNI na dor pós operatória orofacial, realizou-se a avaliação do limiar basal da hiperalgesia mecânica ou térmica dos animais (grupos independentes), conforme demonstrado na FIGURA 1. Sequencialmente, foi realizado o procedimento da incisão ou sham e após 3 dias, os animais foram tratados com nor-BNI (3 µg) ou veículo administrados na mucosa oral. Por fim, a hiperalgesia mecânica ou térmica foi avaliada a cada hora por 6 horas e 24 e 48 horas depois.

FIGURA 1 – PROTOCOLO DO EXPERIMENTO 1

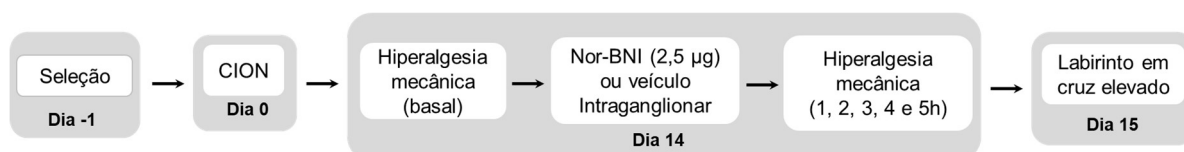


FONTE: O autor (2020).

#### 5.7.2 Experimento 2 - Avaliação temporal do efeito do nor-BNI administrado no gânglio do trigêmeo na hiperalgesia mecânica induzida por CION

Passados 14 dias da CION, realizou-se a avaliação da hiperalgesia mecânica antes e em intervalos de 1 hora após o tratamento dos animais com nor-BNI na dose de 2,5 µg (NATION et al., 2018; NAVRATILOVA et al., 2019b) ou veículo pela via intraganglionar. Um dia depois, o comportamento tipo-ansioso foi avaliado com o teste do labirinto em cruz elevado

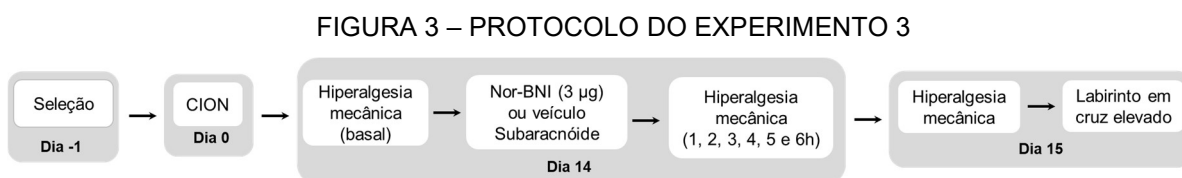
FIGURA 2 – PROTOCOLO DO EXPERIMENTO 2



FONTE: O autor (2020).

### 5.7.3 Experimento 3 - Avaliação temporal do efeito do nor-BNI administrado no subnúcleo *caudalis* na hiperalgesia mecânica e no comportamento do tipo-ansioso induzido por CION

Passados 14 dias da CION, os animais foram submetidos a avaliação da hiperalgesia mecânica (basal) e, em seguida, tratados com nor-BNI ou veículo no SC. A hiperalgesia mecânica foi avaliada por 6 horas, conforme demonstrado na FIGURA 43. Um dia depois, foi realizada uma nova medida e, em seguida, o comportamento tipo-ansioso foi avaliado com o teste do labirinto em cruz elevado.



FONTE: O autor (2020).

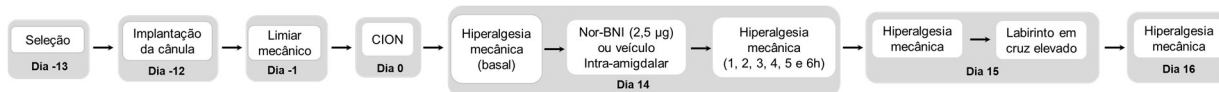
Como não foi observado diferença entre os grupos CION e Sham no teste do LCE (dados não apresentados), possivelmente porque a injeção no SC junto com a avaliação por 6 horas da hiperalgesia mecânica tenha sido ansiogênica para os animais, foi realizado um grupo independente para a avaliação do comportamento tipo-ansioso. Neste experimento, a hiperalgesia mecânica foi avaliada uma vez no dia 14 e no dia 15 os animais foram submetidos ao teste do LCE.

### 5.7.4 Experimento 4 - Avaliação temporal do efeito do nor-BNI na amígdala na hiperalgesia mecânica e no comportamento do tipo-ansioso induzido por CION

Nesse experimento, 12 dias antes da CION foi realizada a cirurgia para implantação da cânula, e no dia 14 após a CION veículo ou nor-BNI foram administrados na amígdala na dose de 2,5 µg (NATION et al., 2018; NAVRATILOVA et al., 2019b). A hiperalgesia mecânica foi avaliada por 6 horas, conforme demonstrado na FIGURA 4. Um dia depois, foi realizada uma nova medida e, em seguida, o comportamento tipo-ansioso foi avaliado com o teste do labirinto em cruz elevado.

Para verificar se os animais não desenvolveram hiperalgesia devido à cirurgia para implantação da cânula, antes da CION foi realizada uma avaliação do limiar mecânico.

FIGURA 4 - PROTOCOLO DO EXPERIMENTO 4



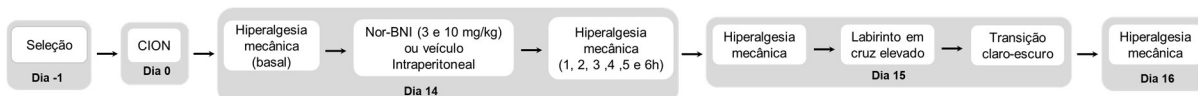
FONTE: O autor (2020).

Como não foi observado diferença entre os grupos CION e Sham no teste do LCE (dados não apresentados), possivelmente porque a cirurgia da implantação da cânula juntamente com a injeção CeA e a avaliação por 6 horas da hiperalgesia mecânica tenha sido ansiogênica para os animais, foi realizado um grupo independente para a avaliação do comportamento tipo-ansioso. Neste experimento, a hiperalgesia mecânica foi avaliada uma vez no dia 14 e no dia 15 os animais foram submetidos ao teste do LCE.

#### 5.7.5 Experimento 5 - Avaliação temporal do tratamento sistêmico com nor-BNI na hiperalgesia mecânica e no comportamento do tipo-ansioso induzido por CION

Por fim, o efeito do tratamento sistêmico com nor-BNI nas doses de 3 mg/kg (NATION et al., 2018; XIE et al., 2017) e 10 mg/kg (BRUCHAS et al., 2007; GREEN et al., 2005; MUNRO et al., 2012a; TEJEDA et al., 2015; WANG et al., 2016; XU, 2004; ZHANG et al., 2005) ou veículo foi investigado na hiperalgesia mecânica induzida por CION de 1 à 6 horas após o tratamento. Após 24 horas, foi realizado uma nova medida do limiar mecânico, seguido do LCE elevado e do TCE. 48 horas após o tratamento, a última medida da hiperalgesia mecânica foi realizada conforme a FIGURA 5.

FIGURA 5 - PROTOCOLO DO EXPERIMENTO 5



FONTE: O autor (2020).

## 5.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada com o software Graph-Pad Prism 7. Todos os dados experimentais foram avaliados quanto à sua distribuição se simétrica ou assimétrica usando o teste de normalidade de D'Agostino & Pearson. Os dados obtidos na avaliação da hiperalgesia mecânica e térmica foram analisados por análise de variância (ANOVA) de duas vias de medidas repetidas enquanto os resultados da avaliação do comportamento do tipo ansioso foram analisados por ANOVA de uma via. Para a análise *post hoc* foi utilizado o teste de Bonferroni. Os resultados foram reportados como média  $\pm$  Erro Padrão da Média (EPM). As diferenças entre os grupos foram consideradas significantes quando  $p \leq 0.05$ .

## 6 RESULTADOS

### 6.1 EXPERIMENTO 1 - AVALIAÇÃO TEMPORAL DO EFEITO DO NOR-BNI ADMINISTRADO NA MUCOSA ORAL NA HIPERALGESIA TÉRMICA E MECÂNICA NA DOR PÓS-OPERATÓRIA

A ANOVA de duas vias mostrou efeito significativo dos fatores grupo experimental [ $F(2, 13) = 53,46$ ,  $P < 0,0001$ ], tempo [ $F(9, 117) = 34,5$ ,  $P < 0,0001$ ] e interação entre esses dois fatores [ $F(18, 117) = 5,01$ ,  $P < 0,0001$ ] na latência para resposta ao calor dos animais. Como pode ser observado na FIGURA 6A, a análise *post hoc* de Bonferroni mostrou que a incisão da mucosa oral foi capaz de promover hiperalgesia térmica (ao calor) no 3º e 4º dia após a cirurgia se comparado com o grupo sham ( $P < 0,05$ ). O tratamento com nor-BNI (2,5 µg), em animais com dor pós-operatória, reduziu a hiperalgesia térmica de 1 até 6 horas após sua administração ( $P < 0,05$ ) em relação ao grupo incisão-veículo. Com relação ao estímulo mecânico (FIGURA 6B), a ANOVA de duas vias mostrou efeito dos fatores grupo experimental [ $F(2,20) = 48,2$ ,  $P < 0,0001$ ], tempo [ $F(7,140) = 25,03$ ,  $P < 0,0001$ ] e interação entre esses dois fatores [ $F(14,140) = 10,34$ ,  $P < 0,0001$ ]. O teste *post hoc* de Bonferroni mostrou hiperalgesia mecânica 3 dias após a cirurgia (1-6 horas), em comparação com o grupo sham ( $P < 0,05$ ) sendo que o tratamento com nor-BNI reverteu esse efeito de 1 a 5 horas após a sua administração ( $P < 0,05$ ).

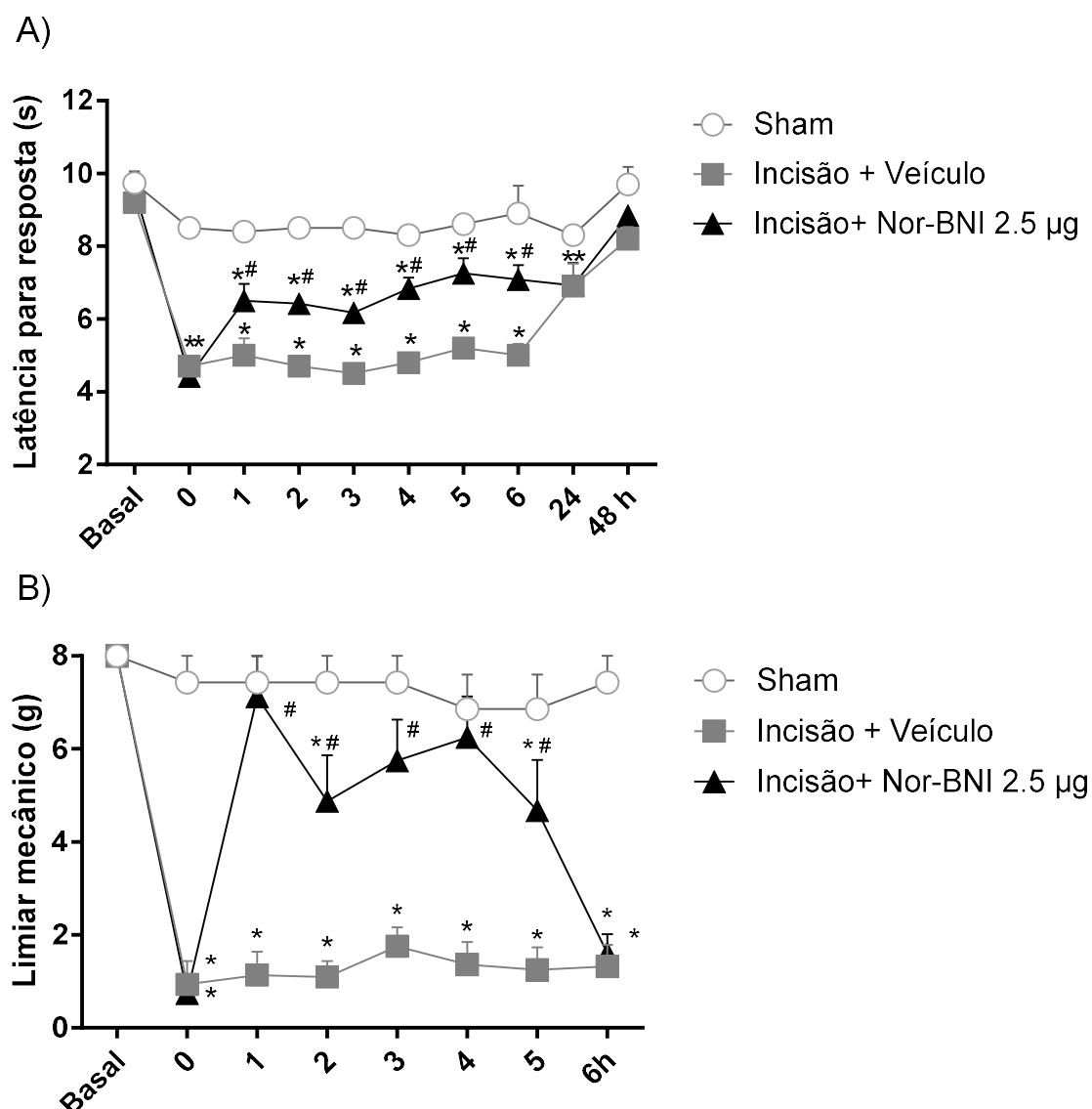


FIGURA 6 - DECURSO TEMPORAL DO EFEITO DO NOR-BNI ADMINISTRADO NA MUCOSA ORAL NA HIPERALGESIA TÉRMICA (PAINEL A) E MECÂNICA (PAINEL B) NO MODELO DE INCISÃO. A latência para resposta ao calor e o limiar mecânico foram avaliados antes (basal) e 3 dias após a incisão da mucosa. Após a injeção de nor-BNI ou veículo na mucosa oral e a hiperalgesia térmica foi avaliada por 6 horas com intervalos de 1 hora e, novamente, 24 e 48 horas após os tratamentos. O limiar mecânico foi avaliado por 6 horas, com intervalos de 1 hora, após os tratamentos. Os valores representam média + E.P.M, analisados utilizando ANOVA de duas vias seguida de teste de Bonferroni (n=5-8/grupo). \*P<0,05 em relação ao grupo sham e #P<0,05 em relação ao grupo incisão + veículo.

## 6.2 EXPERIMENTO 2: AVALIAÇÃO TEMPORAL DO EFEITO DO NOR-BNI

### ADMINISTRADO NO TG NA HIPERALGESIA MECÂNICA INDUZIDA POR CION

A ANOVA de duas vias mostrou efeito dos fatores grupo experimental [F (2, 23) = 53,36, P <0,0001], tempo [F (7, 161) = 49,11, P <0,0001] e interação [F (14, 161) = 10,58, P <0,0001] no limiar mecânico dos animais, conforme pode ser observado na



FIGURA 7. O teste *post hoc* de Bonferroni mostrou que o CION ocasiona redução do limiar mecânico em comparação com o grupo sham ( $P < 0,05$ ) e a administração de nor-BNI (2,5  $\mu\text{g}$ ) no TG aumentou o limiar mecânico de 2 até 4 horas após o tratamento ( $P < 0,05$ ). A ANOVA de uma via demonstrou efeito do grupo experimental no teste do LCE no tempo de permanência nos braços abertos [ $F(2, 19) = 4.671$ ,  $P = 0.0224$ , FIGURA 8A], e nos braços fechados [ $F(2, 19) = 5.387$ ,  $P = 0.0140$ ; FIGURA 8B], mas não no número de entradas nos braços abertos [ $F(2, 20) = 2.04$ ,  $P > 0,05$ , FIGURA 8C] e fechados [ $F(2, 19) = 0.7458$ ,  $P > 0,05$ , FIGURA 8D]. O teste *post hoc* de Bonferroni revelou que a administração de nor-BNI (2,5  $\mu\text{g}$ ) intraganglionar não promoveu mudanças no teste comportamental dos animais se comparado ao grupo CION em nenhum dos parâmetros analisados (FIGURA 8). Enquanto o grupo CION apresentou uma redução no tempo nos braços abertos, se comparado com o sham ( $P < 0,05$ ), i.e., houve um aumento no comportamento tipo-ansioso. Os animais não apresentaram prejuízo locomotor visto que o número total de entradas não diferiu entre os grupos (dados não apresentados) ( $P > 0,05$ ).

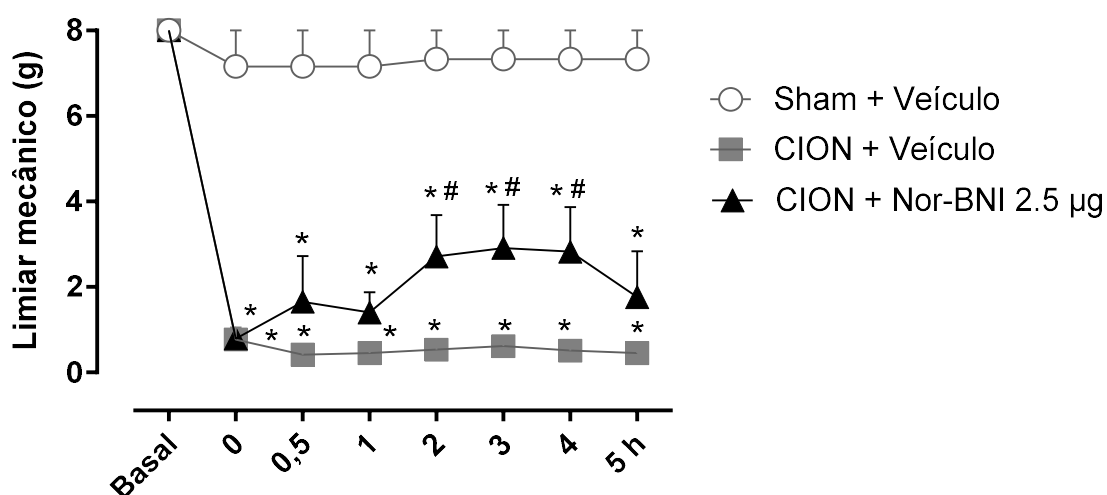


FIGURA 7 - DECURSO TEMPORAL DO EFEITO DO NOR-BNI ADMINISTRADO NO TG NA HIPERALGESIA MECÂNICA PROMOVIDA PELO CION. O limiar mecânico foi avaliado antes (basal) e 14 dias após a CION. Foi realizada a injeção de nor-BNI ou veículo no TG e o limiar mecânico foi avaliado por um período de 5 horas com intervalos de 1 hora, após os tratamentos. Os valores representam média + E.P.M, analisados utilizando ANOVA de duas vias seguida de teste de Bonferroni ( $n = 6-11/\text{grupo}$ ). \* $P < 0,05$  em relação ao grupo Sham + Veículo e # $P < 0,05$  em relação ao grupo CION + Veículo

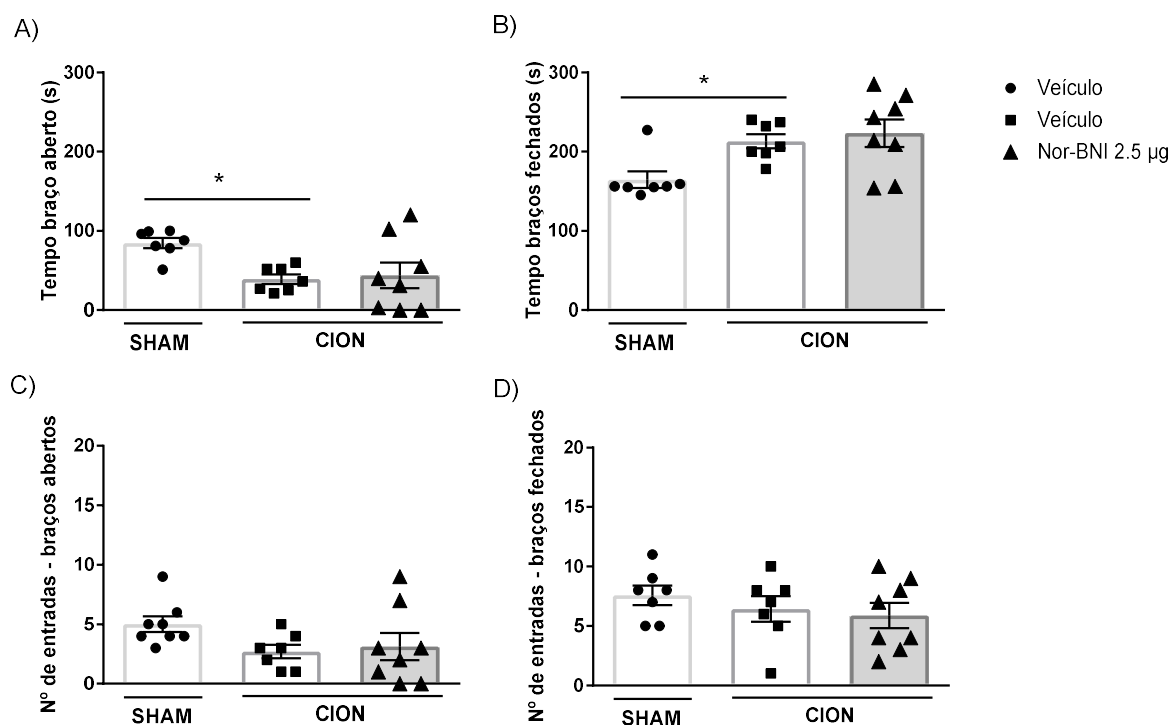


FIGURA 8 - EFEITO DO NOR-BNI ADMINISTRADO NO TG SOBRE O COMPORTAMENTO DO TIPO-ANSIOSO APÓS CION. O comportamento do tipo-ansioso foi avaliado utilizando o labirinto em cruz elevado, 15 dias após a CION. A injeção de nor-BNI ou veículo no TG foi realizada 24 horas antes (dia 14). Os painéis mostram o tempo em segundos que o animal permanece no braço aberto (painel A); o tempo em segundos que o animal permanece no braço fechado (painel B); o número de entradas que o animal realiza no braço aberto (painel C) e o número de entradas que o animal realiza no braço fechado (painel D). Os valores representam média  $\pm$  E.P.M, analisados utilizando ANOVA de uma via seguida de teste de Bonferroni ( $n=7-8$ /grupo). \* $P<0,05$  em relação ao grupo Sham + Veículo.

### 6.3 EXPERIMENTO 3: AVALIAÇÃO TEMPORAL DO EFEITO DO NOR-BNI ADMINISTRADO VIA SUBARACNÓIDE NA HIPERALGENSIA MECÂNICA E NO COMPORTAMENTO DO TIPO-ANSIOSO INDUZIDO POR CION

Como observado na FIGURA 9, a ANOVA de duas vias mostrou efeito significativo dos fatores grupo experimental [ $F(2,21) = 210,7$ ,  $P<0,0001$ , tempo [ $F(8, 168) = 162,3$ ,  $P<0,0001$ ] e interação [ $F(16, 168) = 36,5$ ,  $P<0,0001$ ] no limiar mecânico dos animais. O teste *post hoc* de Bonferroni mostrou que a cirurgia CION foi capaz de promover hiperalgesia mecânica em todas as medidas, quando comparado com os animais do grupo sham ( $P<0,05$ ). Entretanto, o tratamento com nor-BNI na dose de 3 µg subaracnóide não modificou o limiar mecânico ( $P>0,05$ ).

Em outro grupo de animais, como observado na FIGURA 10, a ANOVA de duas vias mostrou o efeito dos fatores grupo experimental [ $F(2, 13) = 19,44$ ,  $P =$

0,0001], tempo [ $F(1, 13) = 247,7$ ,  $P < 0,0001$ ] e interação [ $F(2, 13) = 19,44$ ,  $P = 0,0001$ ]. Foi confirmando o desenvolvimento de hiperalgesia 14 dias após a cirurgia nos grupos CION, se comparado com o sham ( $P < 0,05$ ), através do teste *post hoc* de Bonferroni. A ANOVA de uma via demonstrou efeito do grupo experimental no teste do LCE no tempo de permanência nos braços abertos [ $F(2, 13) = 6,411$ ,  $P = 0,0116$ , FIGURA 11A], mas não nos braços fechados [ $F(2, 13) = 1,382$ ,  $P > 0,05$ ; FIGURA 11B], número de entradas nos braços abertos [ $F(2, 13) = 4,063$ ,  $P = 0,0426$ , FIGURA 11C] e fechados [ $F(2, 13) = 0,7177$ ,  $P = 0,5062$ , FIGURA 11D]. O teste *post hoc* de Bonferroni revelou que a administração de nor-BNI (3  $\mu$ g) subaracnóide não promoveu mudanças no teste comportamental dos animais se comparado ao grupo CION em nenhum dos parâmetros analisados, (FIGURA 11). Enquanto o grupo CION apresentou uma redução no tempo nos braços abertos, se comparado com o sham ( $P < 0,05$ ).. Os animais não apresentaram prejuízo locomotor visto que o número total de entradas não diferiu entre os grupos (dados não apresentados) ( $P > 0,05$ ).

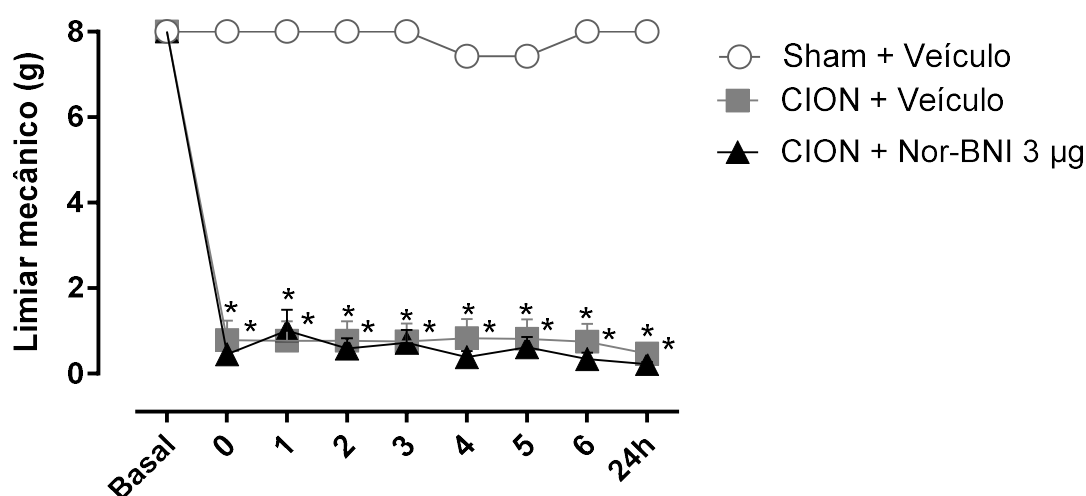


FIGURA 9 - DECURSO TEMPORAL DO EFEITO DE NOR-BNI ADMINISTRADO VIA SUBARACNÓIDE NA HIPERALGESIA MECÂNICA PROMOVIDA PELA CION. O limiar mecânico foi avaliado antes (basal) e 14 dias após a CION. Foi realizada a injeção nor-BNI ou veículo no SC e o limiar mecânico foi avaliado por um período de 6 horas com intervalos de 1 hora e, novamente, 24 horas, após os tratamentos. Os valores representam média + E.P.M, analisados utilizando ANOVA de duas vias seguida de teste de Bonferroni ( $n=7-9$ /grupo). \* $P < 0,05$  em relação ao grupo Sham + Veículo.

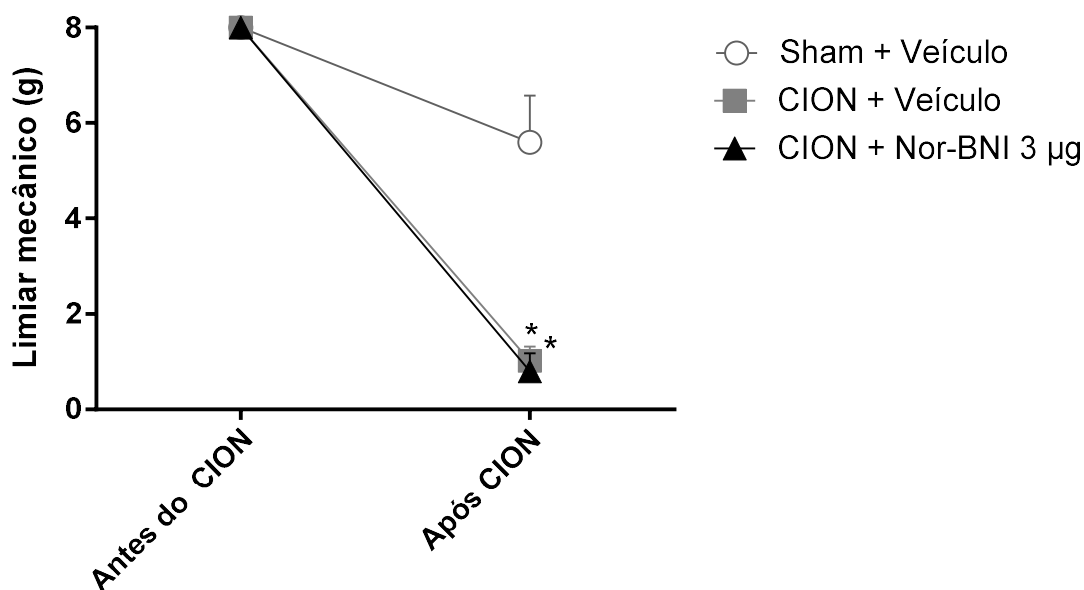


FIGURA 10 - VERIFICAÇÃO DA HIPERALGESIA MECÂNICA APÓS CION. O limiar mecânico foi avaliado antes e 14 dias após a CION. Os valores representam média + E.P.M, analisados utilizando ANOVA de duas vias seguida de teste de Bonferroni (n=5-6/grupo). \*P<0,05 em relação ao grupo Sham + Veículo.

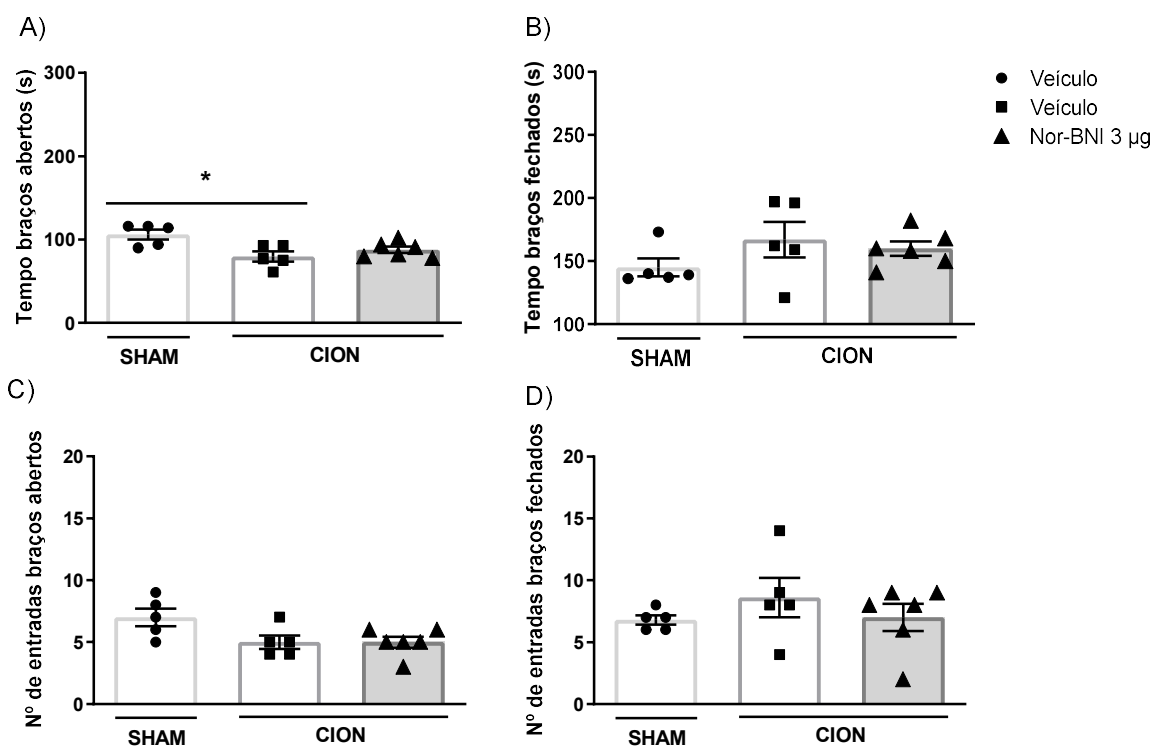


FIGURA 11 - EFEITO DO NOR-BNI ADMINISTRADO VIA SUBARACNÓIDE SOBRE O COMPORTAMENTO DO TIPO-ANSIOSO APÓS CION. O comportamento do tipo-ansioso foi avaliado utilizando o labirinto em cruz elevado, 15 dias após a CION. Sendo que a injeção de nor-BNI ou veículo via subaracnóide foi realizada 24 horas antes (dia 14). Os painéis mostram o tempo em segundos que o animal permanece no braço aberto (painel A); o tempo em segundos que o animal permanece no

braço fechado (painel B); o número de entradas que o animal realiza no braço aberto (painel C) e o número de entradas que o animal realiza no braço fechado (painel D). Os valores representam média  $\pm$  E.P.M, analisados utilizando ANOVA de uma via seguida de teste de Bonferroni ( $n=5-6/\text{grupo}$ ). \* $P<0,05$  em relação ao grupo Sham + Veículo.

#### 6.4 EXPERIMENTO 4 – AVALIAÇÃO TEMPORAL DO EFEITO DO NOR-BNI NO NÚCLEO CEA NA HIPERALGESIA MECÂNICA E NO COMPORTAMENTO TIPO-ANSIOSO INDUZIDA POR CION

A ANOVA de duas vias mostrou efeito dos fatores grupo experimental [ $F(2, 17) = 34,05$ ,  $P < 0,0001$ ], tempo [ $F(10, 170) = 19,51$ ,  $P < 0,0001$ ] e interação [ $F(20, 170) = 4,761$ ,  $P < 0,0001$ ] no limiar mecânico dos animais, conforme FIGURA 12. O teste *post hoc* de Bonferroni mostrou o desenvolvimento de hiperalgesia no grupo CION, 14 dias após a cirurgia quando comparado com o sham ( $P<0,05$ ). O tratamento como nor-BNI na CeA, reverteu a hiperalgesia de 4 a 6 horas, com uma duração do efeito antinociceptivo (2 horas), quando comparado com o grupo CION ( $P<0,05$ ), verificado pelo teste *post hoc* de Bonferroni.

Foi realizado um grupo independente para a avaliação do comportamento tipo-ansioso. A ANOVA de duas vias mostrou efeito dos fatores grupo experimental [ $F(2, 23) = 2,272$ ,  $P=0,1258$ ] e tempo [ $F(1, 23) = 47,62$ ,  $P<0,0001$ ], mas não no fator interação [ $F(2, 23) = 8,163$ ,  $P=0,0021$ ] no limiar mecânico dos animais, conforme FIGURA 13. O teste *post hoc* de Bonferroni mostrou o desenvolvimento de hiperalgesia mecânica no grupo CION, comparado com o sham ( $P<0,05$ ). Foi observado o efeito do grupo experimental no teste do LCE no tempo de permanência nos braços abertos [ $F(2, 20) = 5,9$ ,  $P=0,0097$ , FIGURA 14A], mas não nos braços fechados [ $F(2, 21) = 2,19$ ,  $P=0,1369$ , FIGURA 14B], número de entradas nos braços abertos [ $F(2, 21) = 3,203$ ;  $P=0,0611$ , FIGURA 14C] e fechados [ $F(2, 21) = 0,5922$ ,  $P=0,5621$ , FIGURA 14D], através da ANOVA de uma via. O teste *post hoc* de Bonferroni revelou que ocorreu uma redução no tempo de permanência dos animais nos braços abertos no grupo CION se comparado ao Sham ( $P<0,05$ ). O tratamento com nor-BNI no núcleo CeA não promoveu uma redução do comportamento tipo-ansioso ( $P>0,05$ ). Nos outros parâmetros analisados, não houve diferença estatística significativa entre os grupos ( $P>0,05$ ), assim como no número total de entradas (dados não apresentados) ( $P>0,05$ ).

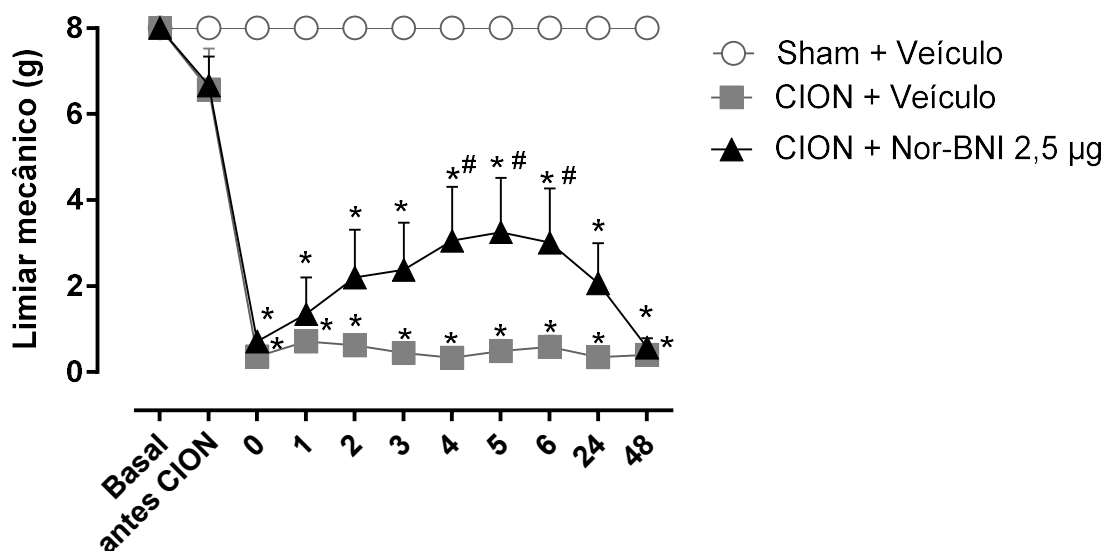


FIGURA 12 – DECURSO TEMPORAL DO EFEITO DO NOR-BNI ADMINISTRADO NO NÚCLEO CEA NA HIPERALGESIA MECÂNICA PROMOVIDA PELA CION. O limiar mecânico foi avaliado antes e 14 dias após a CION. Após a injeção de nor-BNI ou veículo na CeA direita, o limiar mecânico foi avaliado por um período de 6 horas com intervalos de 1 hora, e, novamente, 24 e 48 horas após os tratamentos. Os valores representam média + E.P.M, analisados utilizando ANOVA de duas vias seguida de teste de Bonferroni (n=5-9/grupo). \*P<0,05 em relação ao grupo Sham + Veículo e #P<0,05 em relação ao grupo CION + Veículo.

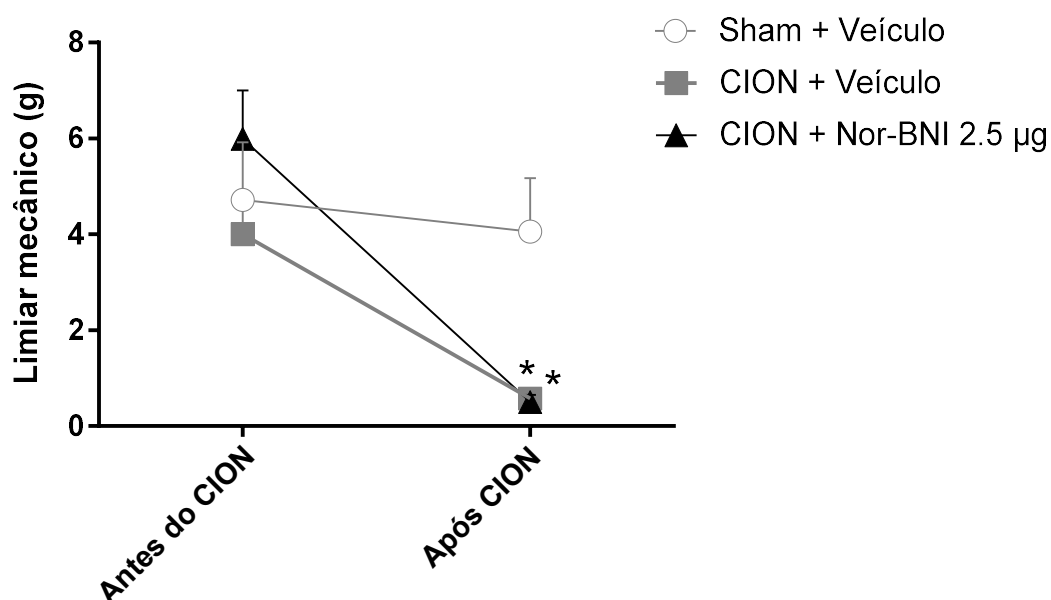


FIGURA 13 - VERIFICAÇÃO DA HIPERALGESIA MECÂNICA APÓS CION. O limiar mecânico foi avaliado antes (basal) e 14 dias após o CION. Os valores representam média + E.P.M, analisados utilizando ANOVA de duas vias seguida de teste de Bonferroni (n=6-10/grupo). \*P<0,05 em relação ao grupo Sham + Veículo.

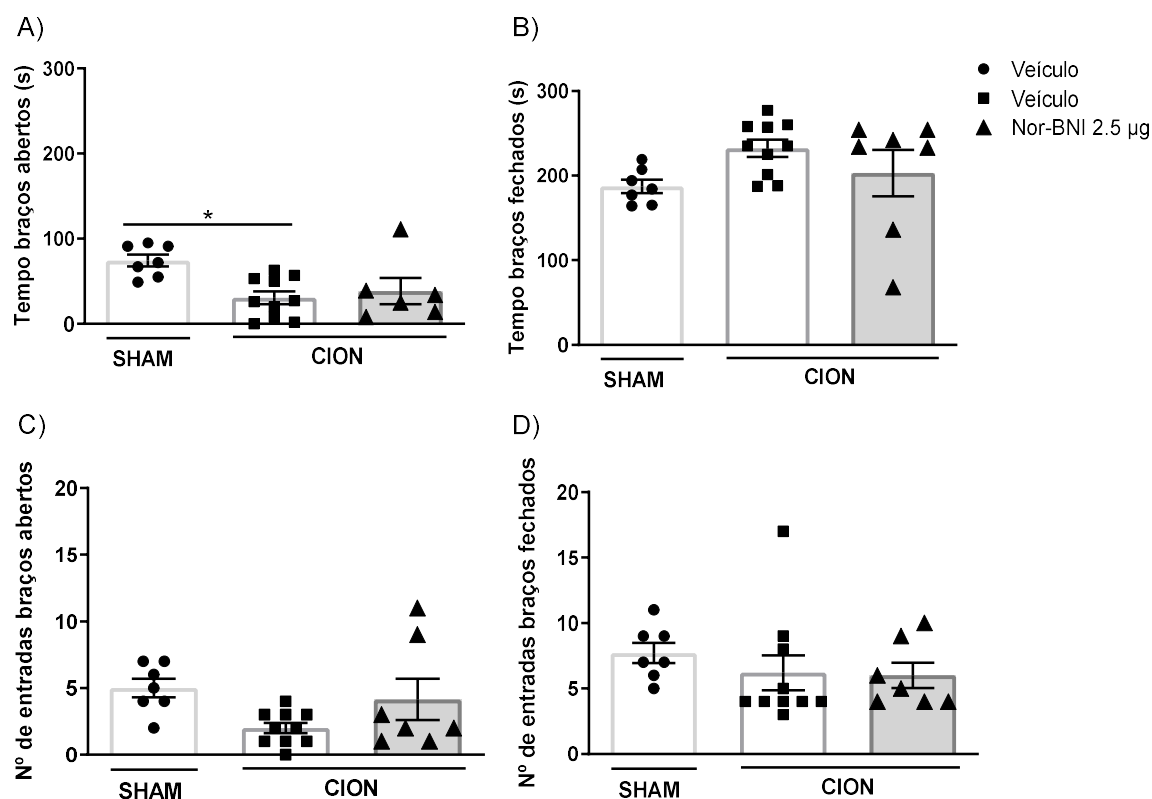


FIGURA 14 – EFEITO DO TRATAMENTO INTRA-AMIGDALAR COM NOR-BNI SOBRE O COMPORTAMENTO DO TIPO-ANSIOSO APÓS CION. O comportamento do tipo-ansioso foi avaliado utilizando o labirinto em cruz elevado, 15 dias após a CION. Sendo que a injeção de nor-BNI ou veículo na CeA direita foi realizada 24 horas antes (dia 14). Os painéis mostram o tempo em segundos que o animal permanece no braço aberto (painel A); o tempo em segundos que o animal permanece no braço fechado (painel B); o número de entradas que o animal realiza no braço aberto (painel C) e o número de entradas que o animal realiza no braço fechado (painel D). Os valores representam média  $\pm$  E.P.M, analisados utilizando ANOVA de uma via seguida de teste de Bonferroni ( $n=6-7$ /grupo). \* $P<0,05$  em relação ao grupo Sham + Veículo.

## 6.5 EXPERIMENTO 5 - AVALIAÇÃO TEMPORAL DO TRATAMENTO SISTÊMICO COM NOR-BNI NA HIPERALGESIA MECÂNICA E NO COMPORTAMENTO TIPO-ANSIOSO INDUZIDO POR CION

A ANOVA de duas vias mostrou efeito dos fatores grupo experimental [ $F(3,36) = 99,74$ ,  $P<0,0001$ ], tempo [ $F(9, 324) = 91,04$ ,  $P<0,0001$ ] e interação [ $F(27, 324) = 13,12$ ,  $P<0,0001$ ] no limiar mecânico dos animais, conforme FIGURA 15. Os animais apresentaram uma redução do limiar mecânico nos dias 14, 15 e 16 depois da cirurgia, se comparado com o grupo sham ( $P<0,05$ ), verificado pelo teste *post hoc* de Bonferroni. O tratamento com nor-BNI 10 mg/kg sistêmico foi capaz de produzir efeito antinociceptivo de 1 a 4 horas, quando comparado com o grupo CION ( $P<0,05$ ).

Contudo, na menor dose de nor-BNI (3 mg/kg) esse efeito não foi observado em nenhum dos tempos avaliados ( $P > 0,05$ ).

A ANOVA de uma via demonstrou efeito do grupo experimental no teste do LCE no tempo de permanência e número de entradas nos braços abertos [ $F(3, 37) = 5,886$ ,  $P < 0,0001$ , FIGURA 16A;  $F(3, 35) = 0,9035$ ,  $P < 0,0048$ , FIGURA 15C, respectivamente] e no tempo nos braços fechados [ $F(3, 35) = 1,925$ ,  $P < 0,0001$ , FIGURA 155B] mas não no número de entradas nos braços abertos [ $F(2, 13) = 0,7177$ ,  $P = 0,5062$ , FIGURA 16D]. O teste *post hoc* de Bonferroni revelou que os animais CION apresentaram comportamento do tipo-ansioso, visto que ocorreu uma redução do tempo e número de entradas nos braços abertos e um aumento no tempo nos braços fechados, comparando-se com o grupo Sham ( $P < 0,05$ ). Na dose de 3 mg/kg, o tratamento com nor-BNI promoveu uma redução no comportamento tipo-ansioso pelo aumento no tempo e número de entradas nos braços abertos e uma redução no tempo nos braços fechados ( $P < 0,05$ ). Da mesma forma, na dose de 10 mg/kg foi observado um aumento no tempo nos braços abertos e uma redução no tempo nos braços fechados ( $P < 0,05$ ). O número total de entradas não apresentou diferença significativa entre os grupos analisados ( $P > 0,05$ ).

No teste do TCE, observou-se o efeito do grupo experimental através da ANOVA de uma via [ $3.43(3, 37) = 3,43$ ,  $P < 0,0001$ , FIGURA 17]. Foi verificado um aumento no comportamento do tipo-ansioso no grupo CION, dado que os animais tiveram um aumento no tempo no compartimento claro se comparado com o grupo sham ( $P < 0,05$ ), analisado pelo teste *pos hoc* de Bonferroni. No entanto, somente no grupo nor-BNI 3 mg/kg houve um aumento no tempo de permanência no compartimento claro ( $P < 0,05$ ), i.e., redução no comportamento do tipo-ansioso.



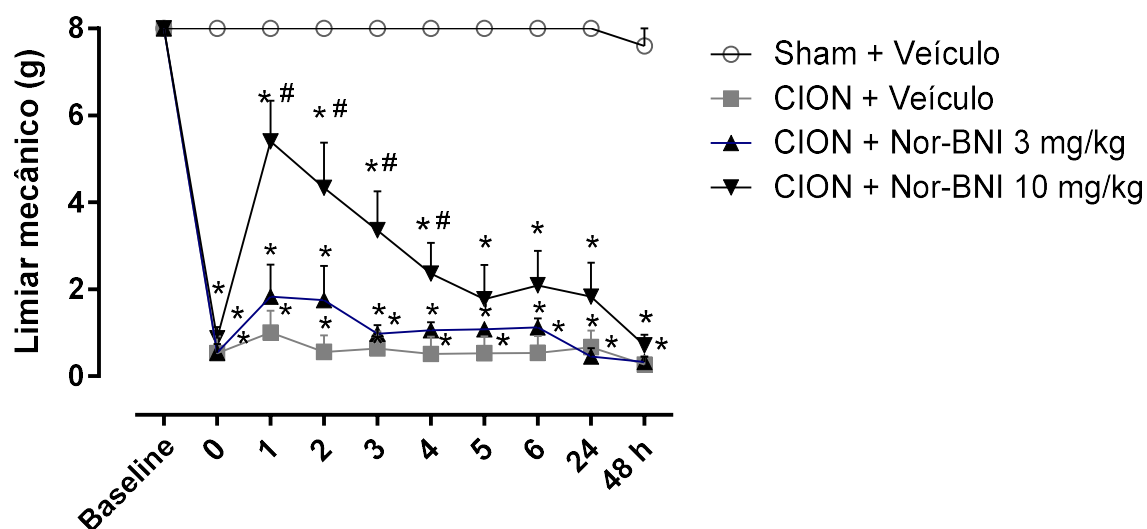


FIGURA 15 - DECURSO TEMPORAL DO NOR-BNI ADMINISTRADO PELA VIA INTRAPERITONEAL NA HIPERALGESIA MECÂNICA PROMOVIDA PELA CION. O limiar mecânico foi avaliado antes (basal) e 14 dias após a CION. Após a injeção de nor-BNI ou veículo intraperitoneal, o limiar mecânico foi avaliado por um período de 6 horas com intervalos de 1 hora, e, novamente, 24 e 48 horas após os tratamentos. Os valores representam média + E.P.M, analisados utilizando ANOVA de duas vias seguida de teste de Bonferroni (n=10-11/grupo). \*P<0,05 em relação ao grupo Sham + Veículo e #P<0,05 em relação ao grupo CION + Veículo.

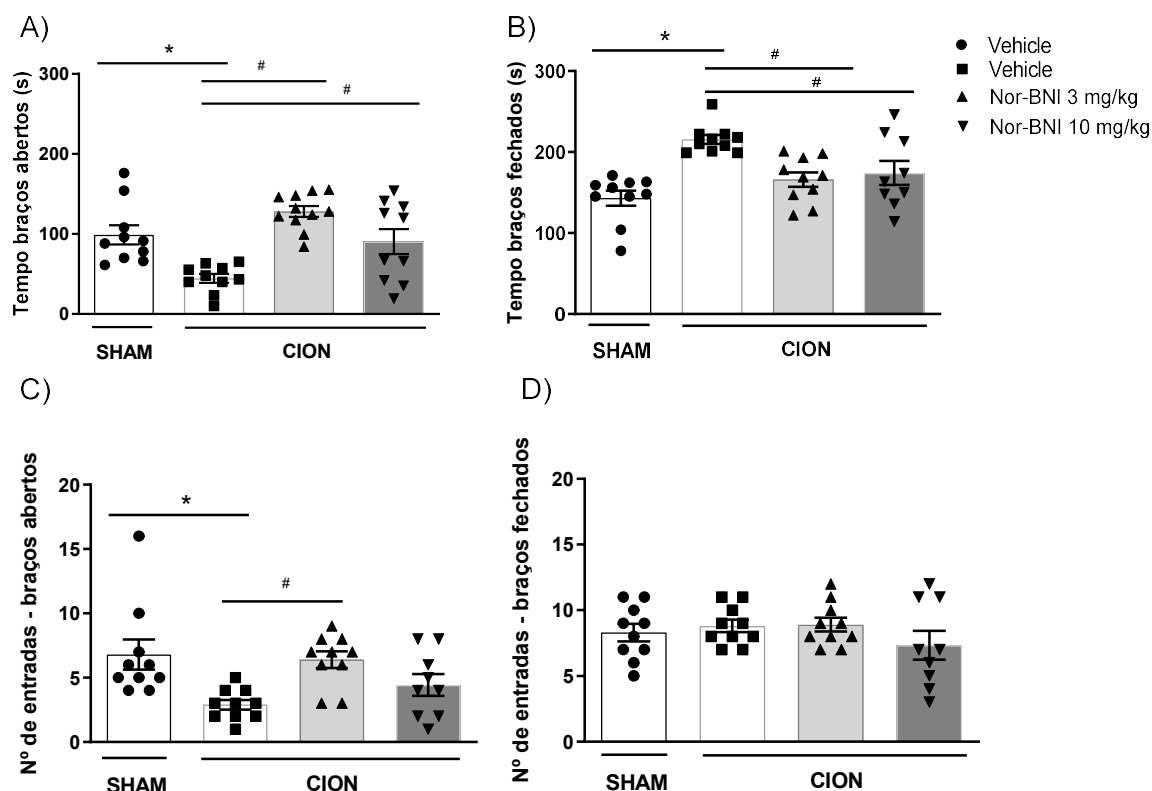


FIGURA 16 – EFEITO DO NOR-BNI ADMINISTRADO PELA VIA INTRAPERITONEAL SOBRE O COMPORTAMENTO DO TIPO-ANSIOSO ATRAVÉS DO LCE APÓS CION. O comportamento do tipo-ansioso foi avaliado utilizando o labirinto em cruz elevado, 15 dias após a CION. Sendo que a injeção de nor-BNI ou veículo intraperitoneal foi realizada 24 horas antes (dia 14). Os painéis mostram o tempo em segundos que o animal permanece no braço aberto (painel A); o tempo em segundos que o animal permanece no braço fechado (painel B); o número de entradas que o animal realiza no braço aberto (painel C) e o número de entradas que o animal realiza no braço fechado (painel D). Os valores representam média  $\pm$  E.P.M, analisados utilizando ANOVA de uma via seguida de teste de Bonferroni ( $n=10-11$ /grupo). \* $P<0,05$  em relação ao grupo Sham + Veículo e # $P<0,05$  em relação ao grupo CION + Veículo.

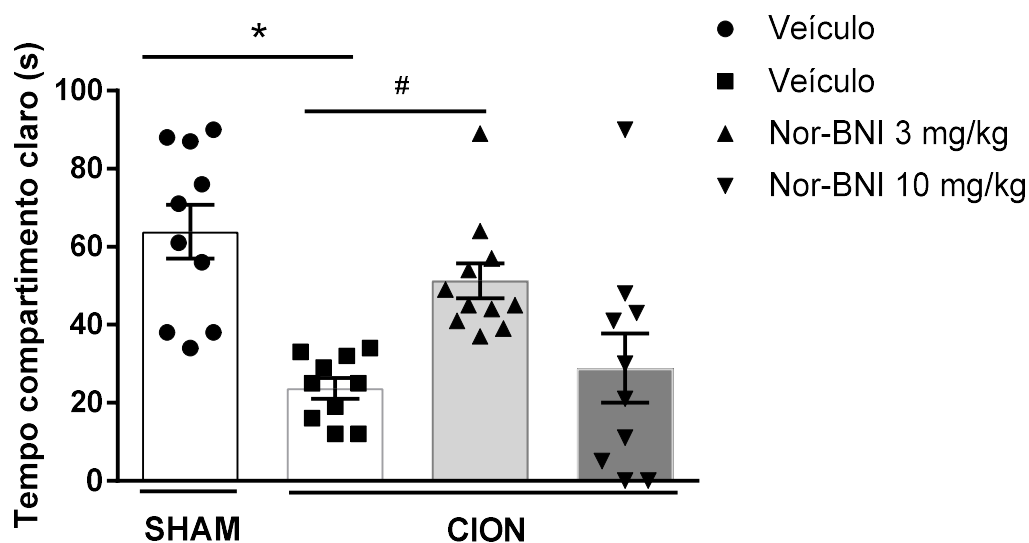


FIGURA 17 – EFEITO DO NOR-BNI ADMINISTRADO PELA VIA INTRAPERITONEAL SOBRE O COMPORTAMENTO DO TIPO-ANSIOSO ATRAVÉS DO TCE APÓS CION. O comportamento do tipo-ansioso foi avaliado utilizando o teste de transição claro-escuro, 15 dias após a CION. A injeção de nor-BNI ou veículo intraperitoneal foi realizada 24 horas antes (dia 14). Os valores representam média  $\pm$  E.P.M, analisados utilizando ANOVA de uma via seguida de teste de Bonferroni (n=10-11/grupo). \*P<0,05 em relação ao grupo Sham + Veículo e #P<0,05 em relação ao grupo CION + Veículo.]

TABELA 1 - RESUMO DOS RESULTADOS DO EFEITO DO TRATAMENTO COM NOR-BNI

MODELO	VIA DE ADMINISTRAÇÃO	HIPERALGESIA TÉRMICA	HIPERALGESIA MECÂNICA	COMPORTAMENTO TIPO-ANSIOSO
Incisão	Administração intramucosa	Antinociceptivo	Antinociceptivo	Não avaliado
CION	Administração intraganglionar	Não avaliado	Antinociceptivo	Sem efeito
	Administração subaracnóide	Não avaliado	Sem efeito	Sem efeito
	Administração intra-amigdal	Não avaliado	Antinociceptivo	Sem efeito
	Administração intraperitoneal	Não avaliado	Antinociceptivo (10 mg/kg)	Ansiolítico (3 e 10 mg/kg)

## 7 DISCUSSÃO

A primeira parte deste estudo buscou avaliar os efeitos do tratamento agudo com nor-BNI no modelo animal de dor pós-operatória induzida por incisão na mucosa intraoral de ratos. Os resultados mostraram que o tratamento com nor-BNI (mucosa oral) foi capaz de reduzir a hiperalgesia mecânica e térmica por 5 e 6 horas, respectivamente. Já na segunda parte, o objetivo foi investigar o efeito local, central e

sistêmico do antagonista de KOR na nocicepção em modelo animal da neuralgia do trigêmeo. Para isso, os animais foram tratados com o nor-BNI no TG, no SC, no núcleo CeA e administrado pela via intraperitoneal. Ademais, o efeito do nor-BNI sobre o comportamento tipo-ansioso foi avaliado nas administrações no SC, núcleo CeA e i.p. Nossos dados mostraram que animais submetidos à CION e tratados com o nor-BNI no TG e no núcleo CeA, mas não no SC, apresentaram efeito antinociceptivo, sem alteração no comportamento do tipo ansioso (SC e núcleo CeA). Por fim, foi observado que o tratamento sistêmico com nor-BNI, somente na maior dose (10 mg/kg) reduziu a hiperalgesia mecânica dos animais. De modo interessante, com a administração sistêmica de nor-BNI observamos um efeito do tipo ansiolítico quando animais foram avaliados nos testes do LCE e TCE.

Como já reportado por experimentos do nosso laboratório (ARAYA et al., 2020b), a incisão da mucosa oral promoveu hiperalgesia térmica e mecânica cerca de 36-48 horas após a cirurgia. O tratamento com nor-BNI foi capaz de reverter esses parâmetros por 4 a 5 horas, demonstrando um efeito antinociceptivo mais prolongado se comparado com a morfina (0,5-1h) no mesmo modelo animal (ARAYA et al., 2020).

Temos conhecimento de apenas um artigo na literatura utilizando drogas que atuam nos receptores kappa opioides na dor pós-cirúrgica orofacial. A enadolina, um agonista de KOR, foi administrada após extração de dentes molares em homens e não foi observado efeito analgésico, mesmo após administração de altas doses (PANDE et al., 1996b). Em modelo de incisão na pata foi reportado que o nor-BNI sistêmico, bem como um inibidor de KOR desenvolvido mais recentemente, o LY2456302 i.t., precipitaram a hiperalgesia após a recuperação do comportamento nociceptivo (CAMPILLO et al., 2011; CUSTODIO-PATSEY et al., 2020). Por outro lado, agonistas de KOR restritos à periferia reduziram a hiperalgesia mecânica (SNYDER et al., 2018). A transição da dor aguda para crônica parece envolver uma redução nos níveis de dopamina no sistema límbico e sugere-se o bloqueio do sistema kappa opioide esteja envolvido no processo de cronificação da dor (VERGARA et al., 2020). O nor-BNI pode estar atuando na cronificação da dor, além de diminuir a dor aguda como demonstrado nos nossos resultados, e pode ter efeitos deletérios quando administrado após a redução da hiperalgesia. No entanto, esses estudos foram realizados em modelos de dor que não afetam o sistema trigeminal. São necessários mais estudos para elucidar esses efeitos na dor orofacial.

Apesar de não avaliarmos o efeito do nor-BNI na ansiedade associada a dor pós-operatória, nosso grupo já demonstrou a presença de comportamento do tipo ansioso neste modelo (ARAYA et al., 2020). Além disso, é válido mencionar que o bloqueio dos KORs pode ser benéfico na prevenção da ansiedade associada com procedimentos cirúrgicos e no estresse que pode promover o desenvolvimento da dor crônica pós-cirúrgica (NAVRATILOVA et al., 2019b). Portanto, o efeito do nor-BNI na ansiedade associada a procedimentos cirúrgicos orofaciais é um aspecto relevante e que ainda precisa ser investigado.

O modelo de neuralgia do trigêmeo que utilizamos na segunda parte do estudo, foi a CION que apresenta características similares às encontradas na clínica, tal como a hiperalgesia mecânica (YOUNIS et al., 2016). Quando submetidos a este procedimento, os animais apresentam hiperalgesia mecânica ipsilateral em um período entre 9 e 120 dias após a cirurgia (CHICHORRO, 2006). De fato, em todos os experimentos foi observado hiperalgesia mecânica nos animais de 14 a 16 dias após a CION. Os KOR são encontrados em diversas estruturas importantes no processamento nociceptivo, dentre essas o TG (BI et al., 2003). O nor-BNI promoveu efeito antinociceptivo no TG de 2 a 4 horas no 14º dia após a CION. Contrariamente, o efeito antinociceptivo dose-dependente local foi observado com um agonista de KOR, o U50,488, após a injeção de formalina na articulação temporomandibular em ratos (CLEMENTE et al., 2004). Além disso, o nor-BNI somente foi utilizado em associação com o U50,488, no qual foi observado um bloqueio parcial do efeito do U50,488 na nocicepção (CLEMENTE et al., 2004). Dessa forma mais estudos são necessários para determinar o papel dos KOR no TG.

O tratamento com nor-BNI (3 µg) pela via subaracnóide a fim de atingir o SC, uma estrutura-chave do processamento nociceptivo, não modificou o limiar mecânico do grupo CION nesse estudo. Estudos prévios do nosso grupo investigaram o papel da dinorfina A no SC (LUIZ et al., 2015) e reforçam os dados obtidos nesse estudo. Foi verificado que a dinorfina A produzia hiperalgesia térmica e mecânica e, corroborando nossos resultados, o tratamento com nor-BNI via subaracnóide não alterava o limiar mecânico desses animais. Além disso, para avaliar a ativação neuronal no sistema trigeminal na dor aguda temporomandibular, utilizaram a marcação para células C-Fos. Assim, verificaram que o agonista de KOR, o U-50,488 não foi capaz de reduzir a ativação de células positivas para C-Fos, presentes no SC

(BEREITER, 2001). Portanto, o SC não parece estar envolvido na antinocicepção observada com o nor-BNI sistêmico.

O comportamento do tipo-ansioso, assim como na clínica, já foi observado em estudos não clínicos de dor neuropática, inflamatória e dor associada ao câncer (BAHAADDINI et al., 2016; GAMBETA et al., 2016; RAOOF et al., 2016; SHANG et al., 2015; WANG et al., 2015a, 2015b). Na neuralgia do trigêmeo, a ansiedade representa uma comorbidade que afeta de forma significativa a qualidade de vida dos pacientes. Os antagonistas de KOR possuem efeitos do tipo ansiolíticos demonstrados em ensaios não clínicos (CARR; LUCKI, 2010; KNOLL et al., 2007, 2011; ROGALA et al., 2012). Dessa forma, foi avaliado o efeito de nor-BNI no modelo da CION em ratos expostos no LCE. No artigo de Gambeta e colaboradores (2018), os animais CION foram submetidos ao LCE e foi demonstrado que somente os animais que desenvolveram hiperalgesia apresentaram um aumento do comportamento tipo-ansioso. Portanto, nesse estudo avaliamos o comportamento tipo-ansioso somente dos animais que foram submetidos a cirurgia da CION. Quando o nor-BNI foi administrado no TG, os animais do grupo CION não apresentaram alteração no comportamento tipo-ansioso. Resultado já esperado, pois de acordo com nosso conhecimento, não há indícios de que essa estrutura possa modular o comportamento tipo-ansioso. O SC, apesar de ser uma estrutura fundamental no processamento nociceptivo, também é capaz de modular a ansiedade induzida pela dor (BAHAADDINI et al., 2016). No entanto, quando o nor-BNI foi administrado pela via subaracnóide não observamos nenhuma alteração no comportamento do tipo ansioso dos animais com CION.

Outra estrutura central envolvida no processamento da dor, bem como das emoções, é a amígdala. Exames de neuroimagem mostraram que existe uma alteração na função e conectividade da amígdala em pacientes com dor crônica. Essas alterações aumentam a atividade do núcleo CeA e amplificam respostas de dor em estados de dor crônica (NAVRATILOVA et al., 2019b). Além disso, a amígdala tem sido relacionada com as interações entre dor e ansiedade (ZHUO, 2016). Dados clínicos e não clínicos correlacionam a ansiedade com um aumento do tamanho da amígdala, bem como sua maior ativação (ADHIKARI, 2014). Ademais, a ativação de vias do núcleo parabraqueal para o núcleo CeA é suficiente para promover comportamentos de afeto negativo, incluindo ansiedade, depressão e aversão em ratos naive (CAI et al., 2018). No presente estudo, o tratamento com nor-BNI na CeA

reverteu a hiperalgesia mecânica induzida pela CION de 4 a 6 horas após a sua administração. Apesar do nor-BNI ser considerado uma droga de longa duração, sendo detectado no cérebro de camundongos 21 dias após a administração sistêmica, (KISHIOKA et al., 2013), dados semelhantes aos nossos com relação ao intervalo de tempo de ação do nor-BNI também foram reportados em outros estudos (CUSTODIO-PATSEY et al., 2020; HORAN et al., 1992). Além disso, já foi demonstrado no estudo de Horan e colaboradores (1992) uma seletividade 100 vezes maior do nor-BNI contra receptores mü opioides, bem como o antagonista não bloqueou a ativação de receptores mü e delta, quando administrados i.c.v. O bloqueio só foi observado quando altas doses do antagonista foram empregadas e no intervalo 0,33 a 0,5 hora. Portanto, nossos dados provavelmente indicam a atuação do nor-BNI nos receptores KOR.

Estudos prévios corroboram os achados com relação aos efeitos do nor-BNI no núcleo CeA. Já foi demonstrada a inibição da aversão à dor tônica no modelo de ligadura do nervo espinal (SNL) e a prevenção da perda do DNIC (Controle inibitório nocivo difuso) na dor cefálica funcional (NATION et al., 2018; NAVRATILOVA et al., 2019b). Um dos mecanismos propostos para este efeito antinociceptivo, baseia-se nas evidências que sugerem que a dor crônica relacionada a lesões pode ser considerada um estado de estresse e que os fatores estressores ativam o CRF (fator de liberação de corticotrofina). Interessante que dados clínicos de pacientes com a NT mostram que estes apresentam altos níveis de cortisol plasmático (STRITTMATTER et al., 1996). Sabe-se que o CRF promove a liberação de opioides endógenos como a dinorfina e ativação dos KOR (CAHILL et al., 2014; NAVRATILOVA et al., 2019a; XIE et al., 2017). Ademais, relata-se que o nor-BNI no núcleo CeA inibiu o disparo de fibras contendo dinorfina e/ou CRF, sugerindo um mecanismo de desinibição na amígdala direita através do antagonista KOR em modelos de lesão de nervos (NAVRATILOVA et al., 2019a). Apesar de não termos estudado essa via e essas interações no presente estudo, é possível que, no presente estudo, o nor-BNI também esteja atuando nessas vias de estresse produzindo uma redução da hiperalgesia.

Apesar dos antagonistas de KOR apresentarem propriedades ansiolíticas (MCLAUGHLIN; MARTON-POPOVICI; CHAVKIN, 2003; NEWTON et al., 2002), pelos nossos dados, pode-se inferir que o núcleo CeA parece não estar envolvido nesse processo. Além dos nossos resultados, um estudo conduzido por Knoll e colaboradores (2011) demonstrou que um antagonista de KOR (JDTic) administrado

no núcleo CeA não induziu um efeito do tipo ansiolítico em animais naive avaliados no teste do LCE. No entanto, no mesmo estudo foi observado um efeito do tipo ansiolítico no teste do LCE após a administração de JD<sub>Tic</sub> em outro núcleo da amígdala, o núcleo basolateral (BLA) (KNOLL et al., 2011).

É importante mencionar que esses dois núcleos desempenham papéis distintos na modulação do comportamento emocional. A BLA recebe informações de aferentes talâmicos e corticais e realiza o processamento inicial de sinais que predizem ameaças. A BLA faz projeções para o núcleo do CeA, o qual realiza a saída do processamento da ansiedade e modula respostas de medo (ADHIKARI, 2014; PALOMARES-CASTILLO et al., 2012). Ambas as estruturas tem-se mostrado um importante componente da regulação do comportamento do tipo ansioso (PALOMARES-CASTILLO et al., 2012).

Em termos translacionais, um resultado bastante importante do presente estudo foi aquele observado após a administração sistêmica do nor-BNI. O efeito antinociceptivo, ou seja, um aumento do limiar mecânico em animais com CION, foi observado na maior dose (10 mg/kg) e por um período de 3 horas (de 1 a 4 horas após a injeção). Interessante que diferente dos experimentos anteriores com administração da droga no local ou no SNC, o tratamento sistêmico proporcionou um tempo mais prolongado de duração do efeito antinociceptivo.

O efeito antinociceptivo observado com o tratamento sistêmico equivale a períodos de tempo em que o nor-BNI (30 mg/kg, s.c.) está presente em altas quantidades tanto no cérebro quanto no sangue dos animais (KISHIOKA et al., 2013). Esta observação é condizente com os nossos resultados indicando que o antagonismo dos KOR reduz a nocicepção tanto em estruturas periféricas (TG) como centrais (CeA). No entanto, a dose de 3 mg/kg não modificou o limiar mecânico dos animais. As diferenças encontradas na reversão da hiperalgesia nas doses de 3 e 10 mg/kg podem ser explicadas pelo fato de que o antagonismo dos KOR são dose dependente e na dose de 10 mg/kg é alcançado o antagonismo completo dos KORs (RUTTEN et al., 2018a).

Aita e colaboradores (2010) estudaram os KORs em modelo semelhante ao do presente estudo, o pION (ligadura parcial do nervo infraorbital), no qual observou-se que a ativação do sistema kappa opioide reduz o limiar mecânico no modelo do pION, e que camundongos *knock-out* para KOR, não apresentavam alterações na hiperalgesia. Porém, não foi avaliado o efeito dos antagonistas KOR na nocicepção.



Além disso, estudaram a influência dos KOR em células envolvidas na resposta imune. A ausência de ativação dos KOR inibiu a proliferação de macrófagos no SNC (sistema nervoso central) mas aumentou no SNP (sistema nervoso periférico). Ademais, os autores concluíram que existem diferenças entre os efeitos dos KOR no sistema imune entre modelos de dor trigeminal e extra-trigeminal.

Estudos prévios mostram que o bloqueio sistêmico de KOR com nor-BNI (3 mg/kg) resulta também na redução da hiperalgesia cutânea e periorbital no modelo de dor cefálica funcional e na diminuição da liberação de CGRP. Nesse contexto, um antagonista KOR de curta duração (CYM51317), também reverteu a hiperalgesia cutânea e periorbital dos animais (XIE et al., 2017). Além disso, o nor-BNI na mesma dose recuperou a perda do DNIC na dor funcional (NATION et al., 2018). Contudo, o tratamento sistêmico não produziu efeito antinociceptivo no modelo de SNL. Tem sido extensivamente relatado que o efeito de drogas que atuam no sistema kappa opioide varia dependendo da via de administração realizada, seletividade pelos receptores, espécie e sexo do animal testado e modelo animal (PODVIN; YAKSH; HOOK, 2016; RASAKHAM; LIU-CHEN, 2011). No entanto, apesar de existirem muitos estudos contraditórios na literatura com relação aos efeitos dos KOR, quando avaliamos estudos com antagonistas KOR em dores que envolvem o sistema trigeminal, os resultados sugerem efeitos benéficos no controle da dor. (NATION et al., 2018; NAVRATILOVA et al., 2019a; XIE et al., 2017).

Com relação ao comportamento do tipo-ansioso, em todos os experimentos foi observado um aumento no comportamento tipo-ansioso nos animais do grupo CION. o tratamento sistêmico com nor-BNI foi capaz de induzir um efeito do tipo ansiolítico quando os animais foram avaliados no teste do LCE, ou seja, o tratamento aumentou o tempo nos braços abertos, nas duas doses, e o número de entradas nos braços abertos (3 mg/kg). Esse resultado não foi observado com os tratamentos locais ou central com nor-BNI, o que nos impede de sugerir um sítio de ação para esse efeito. Como não houve alteração no número do entradas nos braços fechados, sugerimos que os tratamentos não interferem na locomoção dos animais. O LCE é um teste que baseia-se no fato que os roedores evitam naturalmente os braços abertos do aparato e os compostos ansiolíticos normalmente aumentam a exploração nesses braços sem alterar o número de entradas de braços fechados, caracterizando um efeito do tipo ansiolítico (PELLOW et al., 1985). Ademais, foi verificado o aumento do tempo no compartimento claro no teste do TCE (menor dose), o qual avalia o comportamento

tipo-ansioso de acordo com tempo que os animais ficam em ambientes altamente iluminados. Assim, podemos concluir que o tratamento sistêmico com um antagonista de KOR reduziu o comportamento do tipo-ansioso dos animais, demonstrando propriedades ansiolíticas no modelo da CION. Dando suporte aos nossos resultados, foi observado que antagonistas de KOR como o nor-BNI e o JDTic promoveram o aumento no tempo nos braços abertos no LCE em animais naive, sem alterar a atividade locomotora (KNOLL et al., 2007).

Os resultados desse trabalho sugerem que os efeitos antinociceptivo e tipo-ansiolítico do nor-BNI possuem uma duração de efeito diferentes no modelo da CION. Foi observado um efeito antinociceptivo curto (1-6 horas) e o efeito tipo-ansiolítico longo (24 horas) do nor-BNI. Lembrando que não foi realizado a medida do comportamento tipo-ansioso nos tempos em que o nor-BNI apresentava efeito antinociceptivo. Além disso, analisando os dados do artigo de Gambeta e colaboradores (2018), pode-se observar uma causalidade do efeito hiperalgésico no comportamento tipo-ansioso dos animais. Visto que somente os animais hiperalgésicos apresentavam um aumento do comportamento tipo-ansioso. Nossos resultados indicam que além disso, o mecanismo do efeito antinociceptivo pode ser diferente do efeito tipo-ansiolítico, pois foi observado efeito antinociceptivo do nor-BNI sem afetar o comportamento tipo-ansioso dos animais. No entanto, mais estudos são necessários para avaliar se essas duas propriedades são observadas ao mesmo tempo.

É importante considerar que agonistas de KOR estritamente periféricos estão sendo testados na clínica, mas sua significância clínica ainda não está totalmente elucidada. É válido mencionar resultados de dois ensaios clínicos realizados com outro agonista KOR de ação periférica e central, a enadolina. No primeiro estudo, pacientes que passaram por cirurgias ginecológicas ou obstétricas foram tratados com enadolina intramuscular que se apresentou ineficaz; posteriormente, aumentaram a dose da enadolina que obteve efeito semelhante a morfina (PANDE et al., 1996b). Contudo, o estudo teve que ser interrompido devido aos efeitos neuropsiquiátricos causados pelo aumento de dose (PANDE et al., 1996a). No segundo estudo, pacientes que passaram por cirurgia de extração de dentes molares receberam o tratamento com enadolina intramuscular, e, apesar da droga ter apresentado segurança e tolerabilidade mesmo com o aumento da dose, não teve eficácia analgésica se comparado com o placebo. Esses dados sugerem uma diferença de

efeito do KOR em dores que afetam o sistema trigeminal e dores extra-trigeminais. O fato dos novos compostos que atuam como agonista de KOR serem restritos a periferia evita os efeitos adversos relacionados com os KORs no SNC, como a disforia, alucinações e depressão (BECK et al., 2019; KNOLL et al., 2007). No entanto, os antagonistas de KOR não apresentam esses efeitos adversos, têm demonstrado efeito antinociceptivo e do tipo ansiolítico em dados não clínicos (COLLOCA et al., 2017; HANG et al., 2015; KNOLL et al., 2007; XIE et al., 2017). Ademais, estudos sugerem que essas drogas poderiam tratar o componente afetivo da dor (NAVRATILOVA et al., 2019a).

Baseado no exposto acima e nos nossos dados, e considerando que o tratamento sistêmico é mais relevante clinicamente, o tratamento com nor-BNI na NT parece ser promissor tanto para a dor quanto para a ansiedade.

## 8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo demonstrou o efeito antinociceptivo do antagonista de KOR, nor-BNI, em modelos de dor orofacial pós-operatória e neuropática. Ademais, na dor neuropática, o nor-BNI apresentou efeito antihiperálgésico periférico (TG) e central (CeA), bem como efeito do tipo ansiolítico quando administrado sistemicamente.

Nossos dados sugerem que a ativação de receptores kappa opioides contribuem para a hiperálgesia decorrente da dor pós-operatória e da dor neuropática trigeminal, além de contribuir para a ansiedade associada a esta última condição. Estudos adicionais são necessários para o melhor entendimento da contribuição dos receptores KOR nas dores orofaciais agudas e crônicas, bem como para avaliação do seu potencial no tratamento do aspecto sensorial e afetivo da dor.

## REFERÊNCIAS

- ADHIKARI, A. Distributed circuits underlying anxiety. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, [s. l.], v. 8, n. April, p. 1–6, 2014. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fnbeh.2014.00112/abstract>>
- AITA, M.; BYERS, M. R.; CHAVKIN, C.; XU, M. Trigeminal injury causes kappa opioid-dependent allodynic, glial and immune cell responses in mice. **Molecular Pain**, [s. l.], v. 6, p. 1–14, 2010.
- AMSTADTER, A. Emotion regulation and anxiety disorders. **Journal of Anxiety Disorders**, [s. l.], v. 22, n. 2, p. 211–221, 2008.
- APFELBAUM, J. L.; CHEN, C.; MEHTA, S. S.; GAN, And T. J. Postoperative Pain Experience: Results from a National Survey Suggest Postoperative Pain Continues to Be Undermanaged. **Anesthesia & Analgesia**, [s. l.], v. 97, n. 2, p. 534–540, 2003. Disponível em: <<http://journals.lww.com/00000539-200308000-00042>>
- ARAYA, E. I.; CLAUDINO, R. F.; PIOVESAN, E. J.; CHICHORRO, J. G. Trigeminal Neuralgia: Basic and Clinical Aspects. **Current Neuropharmacology**, [s. l.], v. 18, n. 2, p. 109–119, 2019.
- ARAYA, E. I.; NONES, C. F. M.; FERREIRA, L. E. N.; KOPRUSZINSKI, C. M.; CUNHA, J. M. Da; CHICHORRO, J. G. Role of peripheral and central TRPV1 receptors in facial heat hyperalgesia in streptozotocin-induced diabetic rats. **Brain Research**, [s. l.], v. 1670, p. 146–155, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2017.06.004>>
- ARAYA, E. I.; TURNES, J. de M.; BARROSO, A. R.; CHICHORRO, J. G. Contribution of intraganglionic CGRP to migraine-like responses in male and female rats. **Cephalalgia**, [s. l.], v. 40, n. 7, p. 689–700, 2020.
- BAHAADDINI, M.; KHATAMSAZ, S.; ESMAEILI-MAHANI, S.; ABBASNEJAD, M.; RAOOF, M. The role of trigeminal nucleus caudalis orexin 1 receptor in orofacial pain-induced anxiety in rat. **NeuroReport**, [s. l.], v. 27, n. 15, p. 1107–1113, 2016. Disponível em: <<http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00001756-201610310-00001>>
- BAJWA, Z. H.; SMITH, S. S.; KHAWAJA, S. N.; SCRIVANI, S. J. Cranial Neuralgias. **Oral and Maxillofacial Surgery Clinics of North America**, [s. l.], v. 28, n. 3, p. 351–370, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.coms.2016.04.001>>
- BATHLA, G.; HEGDE, A. N. The trigeminal nerve: An illustrated review of its imaging anatomy and pathology. **Clinical Radiology**, [s. l.], v. 68, n. 2, p. 203–213, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.crad.2012.05.019>>
- BECK, T. C.; HAPSTACK, M. A.; BECK, K. R.; DIX, T. A. Therapeutic potential of kappa opioid agonists. **Pharmaceuticals**, [s. l.], v. 12, n. 2, p. 1–13, 2019.
- BENOLIEL, R.; SHARAV, Y. Chronic orofacial pain. **Current Pain and Headache Reports**, [s. l.], v. 14, n. 1, p. 33–40, 2010.
- BEREITER, D. A. Sex differences in brainstem neural activation after injury to the TMJ region. **Cells Tissues Organs**, [s. l.], v. 169, n. 3, p. 226–237, 2001.
- BI, J.; HU, X.; LOH, H. H.; WEI, L. N. Mouse  $\kappa$ -opioid receptor mRNA differential transport in neurons. **Molecular Pharmacology**, [s. l.], v. 64, n. 3, p. 594–599, 2003.
- BOOM, M.; NIESTERS, M.; SARTON, E.; AARTS, L.; W. SMITH, T.; DAHAN, A. Non-Analgesic Effects of Opioids: Opioid-induced Respiratory Depression. **Curr**

**Pharm Des**, [s. l.], v. 18, p. 5994–6004, 2012.

BROADBEAR, J. H.; STEVENS NEGUS, S.; BUTELMAN, E. R.; DE COSTA, B. R.; WOODS, J. H. Differential effects of systemically administered nor-binaltorphimine (nor-BNI) on  $\kappa$ -opioid agonists in the mouse writhing assay. **Psychopharmacology**, [s. l.], v. 115, n. 3, p. 311–319, 1994.

BRUCHAS, M. R.; YANG, T.; SCHREIBER, S.; DEFINO, M.; KWAN, S. C.; LI, S.; CHAVKIN, C. Long-Acting  $\kappa$  Opioid Antagonists Disrupt Receptor Signaling And Produce Noncompetitive Effects By Activating C-Jun N-Terminal Kinase. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 282, n. 41, p. 29803–29811, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18922463>>

BRUIJNZEEL, A. W. kappa-Opioid receptor signaling and brain reward function. **Brain Research Reviews**, [s. l.], v. 62, n. 1, p. 127–146, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.brainresrev.2009.09.008>>

CAHILL, C. M.; TAYLOR, A. M. W.; COOK, C.; ONG, E.; MORÁN, J. A.; EVANS, C. J. Does the kappa opioid receptor system contribute to pain aversion? **Frontiers in Pharmacology**, [s. l.], v. 5, n. November, p. 1–15, 2014. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fphar.2014.00253/abstract>>

CAI, Y. Q.; WANG, W.; PAULUCCI-HOLTHAUZEN, A.; PAN, Z. Z. Brain circuits mediating opposing effects on emotion and pain. **Journal of Neuroscience**, [s. l.], v. 38, n. 28, p. 6340–6349, 2018.

CAMPILLO, A.; CABAÑERO, D.; ROMERO, A.; GARCÍA-NOGALES, P.; PUIG, M. M. Delayed postoperative latent pain sensitization revealed by the systemic administration of opioid antagonists in mice. **European Journal of Pharmacology**, [s. l.], v. 657, n. 1–3, p. 89–96, 2011.

CARLEZON, W. A.; KRYSTAL, A. D. Kappa-Opioid Antagonists for Psychiatric Disorders: From Bench to Clinical Trials. **Depression and Anxiety**, [s. l.], v. 33, n. 10, p. 895–906, 2016.

CARR, G. V.; LUCKI, I. Comparison of the kappa-opioid receptor antagonist DIPPA in tests of anxiety-like behavior between Wistar Kyoto and Sprague Dawley rats. **Psychopharmacology**, [s. l.], v. 210, n. 2, p. 295–302, 2010. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3624763/pdf/nihms412728.pdf>>

CHICHORRO, J. **Neuralgia do Trigêmeo: estudo de mecanismos e avaliação da participação das endotelinas em um modelo experimental**. 2006. Federal University of Santa Catarina, [s. l.], 2006.

CHICHORRO, J. G.; ZAMPRONIO, A. R.; CABRINI, D. A.; FRANCO, C. R. C.; RAE, G. A. Mechanisms operated by endothelin ETA and ETB receptors in the trigeminal ganglion contribute to orofacial thermal hyperalgesia induced by infraorbital nerve constriction in rats. **Neuropeptides**, [s. l.], v. 43, n. 2, p. 133–142, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.npep.2008.12.001>>

CHICHORRO, J. G.; ZAMPRONIO, A. R.; PETTO SOUZA, G. E.; RAE, G. A. Orofacial cold hyperalgesia due to infraorbital nerve constriction injury in rats: Reversal by endothelin receptor antagonists but not non-steroidal anti-inflammatory drugs. **Pain**, [s. l.], v. 123, n. 1–2, p. 64–74, 2006.

CHICHORRO, J. G.; ZAMPRONIO, A. R.; RAE, G. A. Endothelin ET(B) receptor antagonist reduces mechanical allodynia in rats with trigeminal neuropathic pain. **Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.)**, [s. l.], v. 231, n. 6, p. 1136–1140, 2006. a.

CHICHORRO, J. G.; ZAMPRONIO, A. R.; RAE, G. A. Endothelin ET(B) receptor antagonist reduces mechanical allodynia in rats with trigeminal neuropathic pain. **Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.)**, [s. l.], v. 231, n. 6, p. 1136–

40, 2006. b. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16741064>>

CLEMENTE, J. T.; PARADA, C. A.; VEIGA, M. C. A.; GEAR, R. W.; TAMBELI, C. H. Sexual dimorphism in the antinociception mediated by kappa opioid receptors in the rat temporomandibular joint. **Neuroscience Letters**, [s. l.], v. 372, n. 3, p. 250–255, 2004.

COLLOCA, L.; LUDMAN, T.; BOUHASSIRA, D.; BARON, R.; DICKENSON, A. H.; YARNITSKY, D.; FREEMAN, R.; TRUINI, A.; ATTAL, N.; FINNERUP, N. B.; ECCLESTON, C.; KALSO, E.; BENNETT, D. L.; DWORKIN, R. H.; RAJA, S. N. Neuropathic pain. **Nature Reviews Disease Primers**, [s. l.], v. 3, p. 1–20, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrdp.2017.2>>

CRASKE, M. G.; STEIN, M. B.; ELEY, T. C.; MILAD, M. R.; HOLMES, A.; RAPEE, R. M.; WITTCHEN, H. U. Anxiety disorders. **Nature Reviews Disease Primers**, [s. l.], v. 3, n. May, p. 1–18, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrdp.2017.24>>

CRAWLEY, J.; GOODWIN, F. K. Preliminary report of a simple animal behavior model for the anxiolytic effects of benzodiazepines. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, [s. l.], v. 13, n. 2, p. 167–170, 1980.

CUSTODIO-PATSEY, L.; DONAHUE, R. R.; FU, W.; LAMBERT, J.; SMITH, B. N.; TAYLOR, B. K. Sex differences in kappa opioid receptor inhibition of latent postoperative pain sensitization in dorsal horn. **Neuropharmacology**, [s. l.], v. 163, p. 107726, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2019.107726>>

DE TOLEDO, I. P.; CONTI RÉUS, J.; FERNANDES, M.; PORPORATTI, A. L.; PERES, M. A.; TAKASCHIMA, A.; LINHARES, M. N.; GUERRA, E.; DE LUCA CANTO, G. Prevalence of trigeminal neuralgia: A systematic review. **Journal of the American Dental Association**, [s. l.], v. 147, n. 7, p. 570–576, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.adaj.2016.02.014>>

DI STEFANO, G.; TRUINI, A. Pharmacological treatment of trigeminal neuralgia. **Expert Review of Neurotherapeutics**, [s. l.], v. 17, n. 10, p. 1003–1011, 2017.

FERRÉ, G.; CZAPLICKI, G.; DEMANGE, P.; MILON, A. Structure and dynamics of dynorphin peptide and its receptor. **Vitamins and Hormones**, [s. l.], v. 111, p. 17–47, 2019.

FISCHER, L.; PARADA, C. A.; TAMBELI, C. H. A novel method for subarachnoid drug delivery in the medullary region of rats. **Journal of Neuroscience Methods**, [s. l.], v. 148, n. 2, p. 108–112, 2005.

FRAMPTON, J. E.; FOSTER, R. H. In the Treatment of Generalised Anxiety Disorder. [s. l.], v. 20, n. 8, p. 685–693, 2006.

GAMBETA, E.; BATISTA, M. A.; MASCHIO, G. P.; TURNES, J. de M.; ARAYA, E. I.; CHICHORRO, J. G. Anxiety- but not depressive-like behaviors are related to facial hyperalgesia in a model of trigeminal neuropathic pain in rats. **Physiology and Behavior**, [s. l.], v. 191, n. April, p. 131–137, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2018.04.025>>

GAMBETA, E.; CHICHORRO, J. G.; ZAMPONI, G. W. Trigeminal neuralgia: An overview from pathophysiology to pharmacological treatments. **Molecular Pain**, [s. l.], v. 16, p. 174480692090189, 2020. Disponível em: <<http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1744806920901890>>

GAMBETA, E.; KOPRUSZINSKI, C. M.; DOS REIS, R. C.; ZANOVELI, J. M.; CHICHORRO, J. G. Evaluation of heat hyperalgesia and anxiety like-behaviors in a rat model of orofacial cancer. **Neuroscience Letters**, [s. l.], v. 619, p. 100–105, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.neulet.2016.03.001>>

GAMBETA, E.; KOPRUSZINSKI, C. M.; DOS REIS, R. C.; ZANOVELI, J. M.; CHICHORRO, J. G. Facial pain and anxiety-like behavior are reduced by pregabalin in a model of facial carcinoma in rats. **Neuropharmacology**, [s. l.], v. 125, p. 263–271, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.neuropharm.2017.07.035>>

GAN, T. J. Poorly controlled postoperative pain: Prevalence, consequences, and prevention. **Journal of Pain Research**, [s. l.], v. 10, p. 2287–2298, 2017.

GATCHEL, R. J.; PENG, Y. B.; PETERS, M. L.; FUCHS, P. N.; TURK, D. C. The Biopsychosocial Approach to Chronic Pain: Scientific Advances and Future Directions. **Psychological Bulletin**, [s. l.], v. 133, n. 4, p. 581–624, 2007.

GEAR, R.; LEVINE, J. Antinociception produced by an ascending spino-supraspinal pathway. **The Journal of Neuroscience**, [s. l.], v. 15, n. 4, p. 3154–3161, 1995. Disponível em: <<http://www.jneurosci.org/lookup/doi/10.1523/JNEUROSCI.15-04-03154.1995>>

GLARE, P.; AUBREY, K. R.; MYLES, P. S. Transition from acute to chronic pain after surgery. **The Lancet**, [s. l.], v. 393, n. 10180, p. 1537–1546, 2019. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)30352-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(19)30352-6)>

GREEN, M. J.; PETERSON, S. K.; BAKER, M. W.; FRIEDMAN, C.; HARPER, G. R.; RUBINSTEIN, W. S.; JUNE, A.; MAUGER, D. T. NIH Public Access. [s. l.], v. 7, n. 4, p. 221–229, 2005.

HANG, A.; WANG, Y. J.; HE, L.; LIU, J. G. The role of the dynorphin/k opioid receptor system in anxiety. **Acta Pharmacologica Sinica**, [s. l.], v. 36, n. 7, p. 783–790, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/aps.2015.32>>

HAYES, D. J.; CHEN, D. Q.; ZHONG, J.; LIN, A.; BEHAN, B.; WALKER, M.; HODAE, M. Affective Circuitry Alterations in Patients with Trigeminal Neuralgia. **Frontiers in Neuroanatomy**, [s. l.], v. 11, n. September, p. 1–13, 2017. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fnana.2017.00073/full>>

HIDALGO VICARIO, M. H.; RODRÍGUEZ HERNÁNDEZ, P. R. **DSM-5. manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales. últimas novedades**. [s.l.: s.n.]. v. 17

HOGG, S. A Review of the Validity and Variability of the Elevated Plus-Maze as an Animal Model of Anxiety. [s. l.], v. 54, n. 1, p. 21–30, 1996.

HORAN, P.; TAYLOR, J.; YAMAMURA, H. I.; PORRECA, F. Extremely long-lasting antagonistic actions of nor-binaltorphimine (nor-BNI) in the mouse tail-flick test. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, [s. l.], v. 260, n. 3, p. 1237–1243, 1992. Disponível em: <[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=1312164](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1312164)>

IKUTAME, D.; URATA, K.; OTO, T.; FUJIWARA, S.; IINUMA, T.; SHIBUTA, I.; HAYASHI, Y.; HITOMI, S.; IWATA, K.; SHINODA, M. Aging-related phenotypic conversion of medullary microglia enhances intraoral incisional pain sensitivity. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 21, n. 21, p. 1–17, 2020.

International Classification of Orofacial Pain, 1st edition (ICOP). **Cephalalgia**, [s. l.], v. 40, n. 2, p. 129–221, 2020. Disponível em: <<http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0333102419893823>>

JACKSON, K. J.; CARROLL, F. I.; NEGUS, S. S.; DAMAJ, M. I. Effect of the selective kappa-opioid receptor antagonist JD1c on nicotine antinociception, reward, and withdrawal in the mouse. **Psychopharmacology**, [s. l.], v. 210, n. 2, p. 285–294, 2010. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00213-010-1803-1>>

JOHANNES, C. B.; LE, T. K.; ZHOU, X.; JOHNSTON, J. A.; DWORKIN, R. H. The Prevalence of Chronic Pain in United States Adults: Results of an Internet-Based



Survey. **Journal of Pain**, [s. l.], v. 11, n. 11, p. 1230–1239, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jpain.2010.07.002>>

JOO, W.; YOSHIOKA, F.; FUNAKI, T.; MIZOKAMI, K.; RHOTON, A. L. Microsurgical anatomy of the trigeminal nerve. **Clinical Anatomy**, [s. l.], v. 27, n. 1, p. 61–88, 2014.

JULIUS, D.; BASBAUM, A. I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**, [s. l.], v. 413, n. 6852, p. 203–210, 2001. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/35093019>>

KHADEMI, H.; KAMANGAR, F.; BRENNAN, P.; MALEKZADEH, R. Opioid therapy and its side effects: A review. **Archives of Iranian Medicine**, [s. l.], v. 19, n. 12, p. 870–876, 2016.

KISHIOKA, S.; KIGUCHI, N.; KOBAYASHI, Y.; YAMAMOTO, C.; SAIKA, F.; WAKIDA, N.; KO, M. C.; WOODS, J. H. Pharmacokinetic evidence for the long-lasting effect of nor-binaltorphimine, a potent kappa opioid receptor antagonist, in mice. **Neuroscience Letters**, [s. l.], v. 552, p. 98–102, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.neulet.2013.07.040>>

KNOLL, A. T.; MELONI, E. G.; THOMAS, J. B.; CARROLL, F. I.; CARLEZON, W. A. Anxiolytic-Like Effects of  $\kappa$ -Opioid Receptor Antagonists in Models of Unlearned and Learned Fear in Rats. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, [s. l.], v. 323, n. 3, p. 838–845, 2007. Disponível em: <<http://jpet.aspetjournals.org/cgi/doi/10.1124/jpet.107.127415>>

KNOLL, A. T.; MUSCHAMP, J. W.; SILLIVAN, S. E.; FERGUSON, D.; DIETZ, D. M.; MELONI, E. G.; CARROLL, F. I.; NESTLER, E. J.; KONRADI, C.; CARLEZON, W. A. Kappa opioid receptor signaling in the basolateral amygdala regulates conditioned fear and anxiety in rats. **Biological Psychiatry**, [s. l.], v. 70, n. 5, p. 425–433, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biopsych.2011.03.017>>

KOGA, K.; DESCALZI, G.; CHEN, T.; KO, H.; LU, J.; SON, J.; KIM, T.; KWAK, C.; HUGANIR, R. L.; ZHAO, M.; KAANG, B.; COLLINGRIDGE, G. L.; ZHUO, M. Coexistence of Two Forms of LTP in ACC Provides a Synaptic Mechanism for the Interactions between Anxiety and Chronic Pain. [s. l.], v. 85, n. 2, p. 377–389, 2015.

KRAWCZYK, N.; GREENE, M. C.; ZORZANELLI, R.; BASTOS, F. I. Rising trends of prescription opioid sales in contemporary Brazil, 2009–2015. **American Journal of Public Health**, [s. l.], v. 108, n. 5, p. 666–668, 2018.

LAI, J.; LUO, M. C.; CHEN, Q.; MA, S.; GARDELL, L. R.; OSSIPOV, M. H.; PORRECA, F. Dynorphin A activates bradykinin receptors to maintain neuropathic pain. **Nature Neuroscience**, [s. l.], v. 9, n. 12, p. 1534–1540, 2006.

LEVY, D.; ABDIAN, L.; DEKEL-STEINKELLER, M.; DEFRIN, R. Experimental evidence for weaker endogenous inhibition of trigeminal pain than extra-trigeminal pain in healthy individuals. **Cephalalgia**, [s. l.], v. 38, n. 7, p. 1307–1315, 2018.

LIANG, H.; CHEN, Z.; XIAO, H.; LIN, Y.; HU, Y.; CHANG, L.; WU, H.; WANG, P.; LU, W.; ZHU, D.; LUO, C. nNOS-expressing neurons in the vmPFC transform pPVT-derived chronic pain signals into anxiety behaviors. **Nature Communications**, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 2501, 2020. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41467-020-16198-5>>

LIU, S. S.; PICKENS, S.; BURMA, N. E.; IBARRA-LECUE, I.; YANG, H.; XUE, L.; COOK, C.; HAKIMIAN, J. K.; SEVERINO, A. L.; LUEPTOW, L.; KOMAREK, K.; TAYLOR, A. M. W.; OLMSTEAD, M. C.; CARROLL, F. I.; BASS, C. E.; ANDREWS, A. M.; WALWYN, W.; TRANG, T.; EVANS, C. J.; LESLIE, F. M.; CAHILL, C. M. Kappa opioid receptors drive a tonic aversive component of chronic pain. **Journal of Neuroscience**, [s. l.], v. 39, n. 21, p. 4162–4178, 2019.

LOVE, S.; COAKHAM, H. B. Trigeminal neuralgia: pathology and pathogenesis. **Brain : a journal of neurology**, [s. l.], v. 124, n. Pt 12, p. 2347–2360, 2001. Disponível em: <papers3://publication/uuid/88F8C9A6-6290-4688-BDF2-05E37B5D6354>

LUIZ, A. P.; SCHROEDER, S. D.; RAE, G. A.; CALIXTO, J. B.; CHICHORRO, J. G. Contribution and interaction of kinin receptors and dynorphin A in a model of trigeminal neuropathic pain in mice. **Neuroscience**, [s. l.], v. 300, p. 189–200, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.05.015>>

MAČIANSKYTĖ, D.; JANUŽIS, G.; KUBILIUS, R.; ADOMAITIENĖ, V.; ŠČIUPOKAS, A. Associations Between Chronic Pain and Depressive Symptoms in Patients With Trigeminal Neuralgia. **Medicina**, [s. l.], v. 47, n. 7, p. 386, 2011. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/1010-660X/47/7/386>>

MALAN, T. P.; OSSIPOV, M. H.; GARDELL, L. R.; IBRAHIM, M.; BIAN, D.; LAI, J.; PORRECA, F. Extraterritorial neuropathic pain correlates with multisegmental elevation of spinal dynorphin in nerve-injured rats. **Pain**, [s. l.], v. 86, n. 1–2, p. 185–94, 2000. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10779675>>

MANSOUR, A.; FOX, C. a; BURKE, S.; MENG, F.; THOMPSON, R. C.; AKIL, H.; WATSON, S. J. Mu, delta, and kappa opioid receptor mRNA expression in the rat CNS: an in situ hybridization study. **The Journal of comparative neurology**, [s. l.], v. 350, n. 3, p. 412–438, 1994. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7884049>>

MARFURT, C. F. The central projections of trigeminal primary afferent neurons in the cat as determined by the transganglionic transport of horseradish peroxidase. **Journal of Comparative Neurology**, [s. l.], v. 203, n. 4, p. 785–798, 1981.

MASSALY, N.; COPITS, B. A.; WILSON-POE, A. R.; HIPÓLITO, L.; MARKOVIC, T.; YOON, H. J.; LIU, S.; WALICKI, M. C.; BHATTI, D. L.; SIROHI, S.; KLAAS, A.; WALKER, B. M.; NEVE, R.; CAHILL, C. M.; SHOGHI, K. I.; GEREAU, R. W.; MCCALL, J. G.; AL-HASANI, R.; BRUCHAS, M. R.; MORÓN, J. A. Pain-Induced Negative Affect Is Mediated via Recruitment of The Nucleus Accumbens Kappa Opioid System. **Neuron**, [s. l.], v. 102, n. 3, p. 564–573.e6, 2019.

MASSALY, N.; MORÓN, J. A.; AL-HASANI, R. A Trigger for Opioid Misuse: Chronic Pain and Stress Dysregulate the Mesolimbic Pathway and Kappa Opioid System. **Frontiers in Neuroscience**, [s. l.], v. 10, n. NOV, p. 1–7, 2016. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fnins.2016.00480/full>>

MCLAUGHLIN, J. P.; MARTON-POPOVICI, M.; CHAVKIN, C. Kappa opioid receptor antagonism and prodynorphin gene disruption block stress-induced behavioral responses. **The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience**, [s. l.], v. 23, n. 13, p. 5674–83, 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12843270>>

MCMILLAN, R. Trigeminal Neuralgia - A Debilitating Facial Pain. **Reviews in pain**, [s. l.], v. 5, n. 1, p. 26–34, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26527120>> <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4590083>>

MELEK, L. N.; DEVINE, M.; RENTON, T. The psychosocial impact of orofacial pain in trigeminal neuralgia patients: a systematic review. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, [s. l.], v. 47, n. 7, p. 869–878, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijom.2018.02.006>>

MELEK, L.; SMITH, J.; KARAMAT, A.; RENTON, T. Comparison of the Neuropathic Pain Symptoms and Psychosocial Impacts of Trigeminal Neuralgia and Painful Posttraumatic Trigeminal Neuropathy. **Journal of Oral & Facial Pain and Headache**, [s. l.], v. 33, n. 1, p. 77–88, 2019.

MERCADANTE, S.; ROMUALDI, P. The Therapeutic Potential of Novel Kappa Opioid Receptor-based Treatments. **Current Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 27, n. 12, p. 2012–2020, 2019.

MIKA, J.; ROJEWSKA, E.; MAKUCH, W.; PRZEWLOCKA, B. Minocycline reduces the injury-induced expression of prodynorphin and pronociceptin in the dorsal root ganglion in a rat model of neuropathic pain. **Neuroscience**, [s. l.], v. 165, n. 4, p. 1420–1428, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2009.11.064>>

MINAMI, M.; HOSOI, Y.; TOYA, T.; KATAO, Y.; MAEKAWA, K.; KATSUMATA, S.; YABUUCHI, K.; ONOGI, T.; SATOH, M. In situ hybridization study of k-opioid receptor mRNA in the rat brain. **Neurosci. Lett.**, [s. l.], v. 162, p. 161–164, 1993.

MULA, M.; PINI, S.; CASSANO, G. B. The role of anticonvulsant drugs in anxiety disorders: A critical review of the evidence. **Journal of Clinical Psychopharmacology**, [s. l.], v. 27, n. 3, p. 263–272, 2007.

MUNRO, T. A.; BERRY, L. M.; VAN'T VEER, A.; BÉGUIN, C.; CARROLL, F. I.; ZHAO, Z.; CARLEZON, W. A.; COHEN, B. M. Long-acting ?? opioid antagonists nor-BNI, GNTI and JDTic: Pharmacokinetics in mice and lipophilicity. **BMC Pharmacology**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 1, 2012. a. Disponível em: <????>

MUNRO, T. A.; BERRY, L. M.; VAN'T VEER, A.; BÉGUIN, C.; CARROLL, F. I.; ZHAO, Z.; CARLEZON, W. A.; COHEN, B. M. Long-acting k opioid antagonists nor-BNI, GNTI and JDTic: Pharmacokinetics in mice and lipophilicity. **BMC Pharmacology**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 1, 2012. b. Disponível em: <????>

NARITA, M.; KANEKO, C.; MIYOSHI, K.; NAGUMO, Y.; KUZUMAKI, N.; NAKAJIMA, M.; NANJO, K.; MATSUZAWA, K.; YAMAZAKI, M.; SUZUKI, T. Chronic pain induces anxiety with concomitant changes in opioidergic function in the amygdala. **Neuropsychopharmacology**, [s. l.], v. 31, n. 4, p. 739–750, 2006.

NATION, K. M.; DE FELICE, M.; HERNANDEZ, P. I.; DODICK, D. W.; NEUGEBAUER, V.; NAVRATILOVA, E.; PORRECA, F. Lateralized kappa opioid receptor signaling from the amygdala central nucleus promotes stress-induced functional pain. **PAIN**, [s. l.], v. 159, n. 5, p. 919–928, 2018. Disponível em: <<http://journals.lww.com/00006396-201805000-00011>>

NAVRATILOVA, E.; JI, G.; PHELPS, C.; QU, C.; HEIN, M.; YAKHNITSA, V.; NEUGEBAUER, V.; PORRECA, F. Kappa opioid signaling in the central nucleus of the amygdala promotes disinhibition and aversiveness of chronic neuropathic pain. **Pain**, [s. l.], v. 160, n. 4, p. 824–832, 2019. a.

NAVRATILOVA, E.; JI, G.; PHELPS, C.; QU, C.; HEIN, M.; YAKHNITSA, V.; NEUGEBAUER, V.; PORRECA, F. Kappa opioid signaling in the central nucleus of the amygdala promotes disinhibition and aversiveness of chronic neuropathic pain. **Pain**, [s. l.], v. 160, n. 4, p. 824–832, 2019. b. Disponível em: <<https://journals.lww.com/00006396-201904000-00007>>

NEUBERT, J. K.; MANNES, A. J.; KELLER, J.; WEXEL, M.; IADAROLA, M. J.; CAUDLE, R. M. Peripheral targeting of the trigeminal ganglion via the infraorbital foramen as a therapeutic strategy. **Brain Research Protocols**, [s. l.], v. 15, n. 3, p. 119–126, 2005. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1385299X05000504>>

NEUGEBAUER, V. CHAPTER 15. Amygdala pain mechanisms. **Handbook of experimental pharmacology**, [s. l.], v. 227, p. 261–284, 2015. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/978-3-662-46450-2>>

NEWTON, S. S.; THOME, J.; WALLACE, T. L.; SHIRAYAMA, Y.; SCHLESINGER, L.; SAKAI, N.; CHEN, J.; NEVE, R.; NESTLER, E. J.; DUMAN, R. S.

Inhibition of cAMP response element-binding protein or dynorphin in the nucleus accumbens produces an antidepressant-like effect. **The Journal of Neuroscience**, [s. l.], v. 22, n. 24, p. 10883–10890, 2002.

NONES, C. F. M.; CLAUDINO, R. F.; FERREIRA, L. E. N.; DOS REIS, R. C.; KING, T.; CHICHORRO, J. G. Descending facilitatory pain pathways mediate ongoing pain and tactile hypersensitivity in a rat model of trigeminal neuropathic pain. **Neuroscience Letters**, [s. l.], v. 644, p. 18–23, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.neulet.2017.02.047>>

PAK, D. J.; YONG, R. J.; KAYE, A. D.; URMAN, R. D. Chronification of Pain: Mechanisms, Current Understanding, and Clinical Implications. **Current Pain and Headache Reports**, [s. l.], v. 22, n. 2, 2018.

PALOMARES-CASTILLO, E.; HERNÁNDEZ-PÉREZ, O. R.; PÉREZ-CARRERA, D.; CRESPO-RAMÍREZ, M.; FUXE, K.; PÉREZ DE LA MORA, M. The intercalated paracapsular islands as a module for integration of signals regulating anxiety in the amygdala. **Brain Research**, [s. l.], v. 1476, p. 211–234, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2012.03.047>>

PANDE, A. C.; PYKE, R. E.; GREINER, M.; COOPER, S. A.; BENJAMIN, R.; PIERCE, M. W. Analgesic efficacy of the k-receptor agonist, enadoline, in dental surgery pain. **Clinical Neuropharmacology**, [s. l.], v. 19, p. 92–97, 1996. a.

PANDE, A. C.; PYKE, R. E.; GREINER, M.; WIDEMAN, G. L.; BENJAMIN, R.; PIERCE, M. W. Analgesic Efficacy of Enadoline Versus Placebo or Morphine in Postsurgical Pain. **Clinical Neuropharmacology**, [s. l.], v. 19, n. 5, p. 451–456, 1996. b. Disponível em: <<http://journals.lww.com/00002826-199619050-00009>>

PATWARDHAN, A.; PORRECA, F.; SCHMIDT, W. K.; ANDREJ, A. The opioid crisis and ... reconsidering the use of drugs that affect body temperature. [s. l.], v. 8940, 2018.

PAXINOS, G.; WATSON, C. **The rat brain in stereotaxic coordinates**. 5. ed. san diego: academic press, 2005.

PELLOW, S.; CHOPIN, P.; FILE, S. E.; BRILEY, M. Validation of open : closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **Journal of Neuroscience Methods**, [s. l.], v. 14, n. 3, p. 149–167, 1985.

PETERS, M. F.; ZACCO, A.; GORDON, J.; MACIAG, C. M.; LITWIN, L. C.; THOMPSON, C.; SCHROEDER, P.; SYGOWSKI, L. A.; PISER, T. M.; BRUGEL, T. A. Identification of short-acting k-opioid receptor antagonists with anxiolytic-like activity. **European Journal of Pharmacology**, [s. l.], v. 661, n. 1–3, p. 27–34, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2011.04.017>>

PHELPS, C. E.; NAVRATILOVA, E.; DICKENSON, A. H.; PORRECA, F.; BANNISTER, K. Kappa opioid signaling in the right central amygdala causes hind paw specific loss of diffuse noxious inhibitory controls in experimental neuropathic pain. **Pain**, [s. l.], v. 160, n. 7, p. 1614–1621, 2019.

PODVIN, S.; YAKSH, T.; HOOK, V. The Emerging Role of Spinal Dynorphin in Chronic Pain: A Therapeutic Perspective. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, [s. l.], v. 56, n. 1, p. 511–533, 2016. Disponível em: <<http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-pharmtox-010715-103042>>

POGATZKI-ZAHN, E. M.; SEGELCKE, D.; SCHUG, S. A. Inaugural Review Series Postoperative pain-from mechanisms to treatment. **PAIN Reports**, [s. l.], v. 2, n. e588, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1097/PR9.0000000000000588>>

POGATZKI-ZAHN, E.; SEGELCKE, D.; ZAHN, P. Mechanisms of acute and chronic pain after surgery: update from findings in experimental animal models. **Current opinion in anaesthesiology**, [s. l.], v. 31, n. 5, p. 575–585, 2018.

RAOOF, M.; EBRAHIMNEJAD, H.; ABBASNEJAD, M.; AMIRKHOSRAVI, L.; RAOOF, R.; MAHANI, S. E.; RAMAZANI, M.; SHOKOUHINEJAD, N.; KHOSHKHOUNEJAD, M. The Effects of Inflammatory Tooth Pain on Anxiety in Adult Male Rats. **Basic and Clinical Neuroscience Journal**, [s. l.], v. 7, n. 3, p. 259–268, 2016.

RASAKHAM, K.; LIU-CHEN, L. Y. Sex differences in kappa opioid pharmacology. **Life Sciences**, [s. l.], v. 88, n. 1–2, p. 2–16, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2010.10.007>>

RODRIGUEZ, E.; SAKURAI, K.; XU, J.; CHEN, Y.; TODA, K.; ZHAO, S.; HAN, B. X.; RYU, D.; YIN, H.; LIEDTKE, W.; WANG, F. A craniofacial-specific monosynaptic circuit enables heightened affective pain. **Nature Neuroscience**, [s. l.], v. 20, n. 12, p. 1734–1743, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41593-017-0012-1>>

ROESKA, K.; CECI, A.; TREEDE, R. D.; DOODS, H. Effect of high trait anxiety on mechanical hypersensitivity in male rats. **Neuroscience Letters**, [s. l.], v. 464, n. 3, p. 160–164, 2009.

ROGALA, B.; LI, Y.; LI, S.; CHEN, X.; KIROUAC, G. J. Effects of a Post-Shock Injection of the Kappa Opioid Receptor Antagonist Norbinaltorphimine (norBNI) on Fear and Anxiety in Rats. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 7, n. 11, p. 34–37, 2012.

ROGERS, A. H.; BAKHSHAIE, J.; ZVOLENSKY, M. J.; VOWLES, K. E. Pain Anxiety as a Mechanism Linking Pain Severity and Opioid Misuse and Disability Among Individuals With Chronic Pain. **Journal of Addiction Medicine**, [s. l.], p. 1, 2019.

ROZEN, T. D. Trigeminal neuralgia and glossopharyngeal neuralgia. **Neurologic Clinics**, [s. l.], v. 22, n. 1, p. 185–206, 2004.

RUDA, M. a; IADAROLA, M. J.; COHEN, L. V; YOUNG, W. S. In situ hybridization histochemistry and immunocytochemistry reveal an increase in spinal dynorphin biosynthesis in a rat model of peripheral inflammation and hyperalgesia. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 85, n. 2, p. 622–6, 1988. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=279603&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>

RUTTEN, K.; SCHRÖDER, W.; CHRISTOPH, T.; KOCH, T.; TZSCHENTKE, T. M. Selectivity profiling of NOP, MOP, DOP and KOP receptor antagonists in the rat spinal nerve ligation model of mononeuropathic pain. **European Journal of Pharmacology**, [s. l.], v. 827, n. March, p. 41–48, 2018. a. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2018.03.008>>

RUTTEN, K.; SCHRÖDER, W.; CHRISTOPH, T.; KOCH, T.; TZSCHENTKE, T. M. Selectivity profiling of NOP, MOP, DOP and KOP receptor antagonists in the rat spinal nerve ligation model of mononeuropathic pain. **European Journal of Pharmacology**, [s. l.], v. 827, n. March, p. 41–48, 2018. b. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2018.03.008>>

SCHANK, J. R.; GOLDSTEIN, A. L.; ROWE, K. E.; KING, C. E.; MARUSICH, J. A.; WILEY, J. L.; CARROLL, F. I.; THORSELL, A.; HEILIG, M. The kappa opioid receptor antagonist JD1c attenuates alcohol seeking and withdrawal anxiety. **Addiction Biology**, [s. l.], v. 17, n. 3, p. 634–647, 2012. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1369-1600.2012.00455.x>>

SCHERDER, E. J. A.; PLOOIJ, B. Assessment and Management of Pain, with Particular Emphasis on Central Neuropathic Pain, in Moderate to Severe Dementia. **Drugs & Aging**, [s. l.], v. 29, n. 9, p. 701–706, 2012. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s40266-012-0001-8>>

SCHMIDT, K.; SCHUNKE, O.; FORKMANN, K.; BINGEL, U. Enhanced Short-Term Sensitization of Facial Compared With Limb Heat Pain. **The Journal of Pain**, [s. l.], v. 16, n. 8, p. 781–790, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jpain.2015.05.003>>

SCHWEI, M. J.; HONORE, P.; ROGERS, S. D.; SALAK-JOHNSON, J. L.; FINKE, M. P.; RAMNARAIN, M. L.; CLOHISY, D. R.; MANTYH, P. W. Neurochemical and cellular reorganization of the spinal cord in a murine model of bone cancer pain. **J Neurosci**, [s. l.], v. 19, n. 24, p. 10886–10897, 1999. Disponível em: <[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10594070](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10594070)>

SESSLE, B. J. Acute and chronic craniofacial pain: Brainstem mechanisms of nociceptive transmission and neuroplasticity, and their clinical correlates. **Critical Reviews in Oral Biology and Medicine**, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 57–91, 2000.

SESSLE, B. J. Peripheral and central mechanisms of orofacial pain and their clinical correlates. **Minerva anestesiológica**, [s. l.], v. 71, n. 4, p. 117–36, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15756153>>

SHAEFER, J. R.; KHAWAJA, S. N.; BAVIA, P. F. Sex, Gender, and Orofacial Pain. **Dental Clinics of North America**, [s. l.], v. 62, n. 4, p. 665–682, 2018.

SHANG, L.; XU, T. Le; LI, F.; SU, J.; LI, W. G. Temporal dynamics of anxiety phenotypes in a dental pulp injury model. **Molecular Pain**, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 1–17, 2015.

SHIRAYAMA, Y.; ISHIDA, H.; IWATA, M.; HAZAMA, G. I.; KAWAHARA, R.; DUMAN, R. S. Stress increases dynorphin immunoreactivity in limbic brain regions and dynorphin antagonism produces antidepressant-like effects. **Journal of Neurochemistry**, [s. l.], v. 90, n. 5, p. 1258–1268, 2004.

SNYDER, L. M.; CHIANG, M. C.; LOEZA-ALCOCER, E.; GOLD, M. S.; KOERBER, H. R.; ROSS, S. E.; SNYDER, L. M.; CHIANG, M. C.; LOEZA-ALCOCER, E.; OMORI, Y.; HACHISUKA, J.; SHEAHAN, T. D.; DUQUE, M. G.; LEE, Y. S.; HU, Z.; HUANG, H.; CAI, X.; MEERSCHAERT, K. A.; GOLD, M. S.; KOERBER, H. R.; ROSS, S. E. Kappa Opioid Receptor Distribution and Function in Primary Afferents Article Kappa Opioid Receptor Distribution and Function in Primary Afferents. **Neuron**, [s. l.], v. 99, n. 6, p. 1274–1288.e6, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.08.044>>

SPINA, A.; MORTINI, P.; ALEMANNO, F.; HOUDAYER, E.; IANNACCONE, S. Trigeminal Neuralgia: Toward a Multimodal Approach. **World Neurosurgery**, [s. l.], v. 103, p. 220–230, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.wneu.2017.03.126>>

SPINA, E.; PISANI, F.; PERUCCA, E. Clinically significant pharmacokinetic drug interactions with carbamazepine. **Clinical Pharmacokinetics**, [s. l.], v. 31, n. 3, p. 198–214, 1996.

STEFANO, G. Di; MAARBJERG, S.; NURMIKKO, T.; TRUINI, A.; CRUCCU, G. Triggering trigeminal neuralgia. **Cephalalgia**, [s. l.], v. 0, n. 0, p. 1–8, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1177/0333102417721677>>

STRITTMATTER, M.; GRAUER, M. T.; FISCHER, C.; HAMANN, G.; HOFFMANN, K. H.; BLAES, F.; SCHIMRIGK, K. Autonomic nervous system and neuroendocrine changes in patients with idiopathic trigeminal neuralgia. **Cephalalgia**, [s. l.], v. 16, n. 7, p. 476–480, 1996.

TEJEDA, H. A.; HANKS, A. N.; SCOTT, L.; MEJIAS-APONTE, C.; HUGHES, Z. A.; O'DONNELL, P. Prefrontal Cortical Kappa Opioid Receptors Attenuate Responses to Amygdala Inputs. **Neuropsychopharmacology**, [s. l.], v. 40, n. 13, p. 2856–2864,

2015.

TRANG, T.; AL-HASANI, R.; SALVEMINI, D.; SALTER, M. W.; GUTSTEIN, H.; CAHILL, C. M. Pain and Poppies: The Good, the Bad, and the Ugly of Opioid Analgesics. **Journal of Neuroscience**, [s. l.], v. 35, n. 41, p. 13879–13888, 2015. Disponível em: <<http://www.jneurosci.org/cgi/doi/10.1523/JNEUROSCI.2711-15.2015>>

URATA, K.; SHINODA, M.; HONDA, K.; LEE, J.; MARUNO, M.; ITO, R.; GIONHAKU, N.; IWATA, K. Involvement of TRPV1 and TRPA1 in Incisional Intraoral and Extraoral Pain. **Journal of Dental Research**, [s. l.], v. 94, n. 3, p. 446–454, 2015. Disponível em: <<http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0022034514565645>>

URATA, K.; SHINODA, M.; IKUTAME, D.; IINUMA, T.; IWATA, K. Involvement of transient receptor potential vanilloid 2 in intra-oral incisional pain. **Oral Diseases**, [s. l.], v. 24, n. 6, p. 1093–1100, 2018. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/odi.12853>>

URBANO, M.; GUERRERO, M.; ROSEN, H.; ROBERTS, E. Antagonists of the kappa opioid receptor. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, [s. l.], v. 24, n. 9, p. 2021–2032, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2014.03.040>>

VAN HECKE, O.; AUSTIN, S. K.; KHAN, R. A.; SMITH, B. H.; TORRANCE, N. Neuropathic pain in the general population: A systematic review of epidemiological studies. **Pain**, [s. l.], v. 155, n. 4, p. 654–662, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.pain.2013.11.013>>

VANDERAH, T. W.; GARDELL, L. R.; BURGESS, S. E.; IBRAHIM, M.; DOGRUL, A.; ZHONG, C. M.; ZHANG, E. T.; MALAN, T. P.; OSSIPOV, M. H.; LAI, J.; PORRECA, F. Dynorphin promotes abnormal pain and spinal opioid antinociceptive tolerance. **The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience**, [s. l.], v. 20, n. 18, p. 7074–9, 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10995854>>

VANDERAH, T. W.; LAUGHLIN, T.; LASHBROOK, J. M.; NICHOLS, M. L.; WILCOX, G. L.; OSSIPOV, M. H.; MALAN, P. T.; PORRECA, F. Single intrathecal injections of dynorphin A or des-Tyr-dynorphins produce long-lasting allodynia in rats: blockade by MK-801 but not naloxone. **Pain**, [s. l.], v. 68, n. 2, p. 275–281, 1996. Disponível em: <<http://journals.lww.com/00006396-199612000-00011>>

VERGARA, F.; SARDI, N. F.; PESCADOR, A. C.; GUAITA, G. O.; JARK STERN, C. A.; CHICHORRO, J. G.; FISCHER, L. Contribution of mesolimbic dopamine and kappa opioid systems to the transition from acute to chronic pain. **Neuropharmacology**, [s. l.], v. 178, n. April, p. 108226, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2020.108226>>

VOS, B. P.; STRASSMAN, A. M.; MACIEWICZ, R. J. Behavioral evidence of trigeminal neuropathic pain following chronic constriction injury to the rat's infraorbital nerve. **The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience**, [s. l.], v. 14, n. 5 Pt 1, p. 2708–23, 1994. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8182437>>

WALF, A. A.; FRYE, C. A. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. **Nat Protoc**, [s. l.], v. 2, n. 2, p. 322–328, 2007. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3623971/pdf/nihms452836.pdf>>

WALLACE, V. C. J.; SEGERDAHL, A. R.; BLACKBEARD, J.; PHEBY, T.; RICE, A. S. C. Anxiety-like behaviour is attenuated by gabapentin, morphine and diazepam in a rodent model of HIV anti-retroviral-associated neuropathic pain. **Neuroscience Letters**, [s. l.], v. 448, n. 1, p. 153–156, 2008. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1016/j.neulet.2008.10.005>>

WANG, G. Q.; CEN, C.; LI, C.; CAO, S.; WANG, N.; ZHOU, Z.; LIU, X. M.; XU, Y.; TIAN, N. X.; ZHANG, Y.; WANG, J.; WANG, L. P.; WANG, Y. Deactivation of excitatory neurons in the prelimbic cortex via Cdk5 promotes pain sensation and anxiety. **Nature Communications**, [s. l.], v. 6, n. May, 2015. a.

WANG, J.; LI, Z.-H.; FENG, B.; ZHANG, T.; ZHANG, H.; LI, H.; CHEN, T.; CUI, J.; ZANG, W.-D.; LI, Y.-Q. Corticotrigeminal Projections from the Insular Cortex to the Trigeminal Caudal Subnucleus Regulate Orofacial Pain after Nerve Injury via Extracellular Signal-Regulated Kinase Activation in Insular Cortex Neurons. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, [s. l.], v. 9, n. December, p. 1–15, 2015. b. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fncel.2015.00493/abstract>>

WANG, Y. J.; HANG, A.; LU, Y. C.; LONG, Y.; ZAN, G. Y.; LI, X. P.; WANG, Q.; ZHAO, Z. X.; HE, L.; CHI, Z. Q.; LIU, J. G.  $\kappa$  Opioid receptor activation in different brain regions differentially modulates anxiety-related behaviors in mice. **Neuropharmacology**, [s. l.], v. 110, p. 92–101, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.neuropharm.2016.04.022>>

WETTSTEIN, J. G.; GROUHEL, A. Opioid antagonist profile of SC nor-binaltorphimine in the formalin paw assay. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, [s. l.], v. 53, n. 2, p. 411–416, 1996.

WIFFEN, P. J.; DERRY, S.; MOORE, R. A.; MCQUAY, H. J. Carbamazepine for acute and chronic pain in adults. In: WIFFEN, P. J. (Ed.). **Cochrane Database of Systematic Reviews**. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2011. v. 15p. 335–336.

WU, C. L.; RAJA, S. N. Treatment of acute postoperative pain. **The Lancet**, [s. l.], v. 377, n. 9784, p. 2215–2225, 2011. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)60245-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(11)60245-6)>

XIE, J. Y.; DE FELICE, M.; KOPRUSZINSKI, C. M.; EYDE, N.; LAVIGNE, J.; REMENIUK, B.; HERNANDEZ, P.; YUE, X.; GOSHIMA, N.; OSSIPOV, M.; KING, T.; STREICHER, J. M.; NAVRATILOVA, E.; DODICK, D.; ROSEN, H.; ROBERTS, E.; PORRECA, F. Kappa opioid receptor antagonists: A possible new class of therapeutics for migraine prevention. **Cephalalgia**, [s. l.], v. 37, n. 8, p. 780–794, 2017.

XU, M. Neuropathic Pain Activates the Endogenous Opioid System in Mouse Spinal Cord and Induces Opioid Receptor Tolerance. **Journal of Neuroscience**, [s. l.], v. 24, n. 19, p. 4576–4584, 2004. Disponível em: <<http://www.jneurosci.org/cgi/doi/10.1523/JNEUROSCI.5552-03.2004>>

YALCIN, I.; BARROT, M. The anxiodepressive comorbidity in chronic pain. **Current Opinion in Anaesthesiology**, [s. l.], v. 27, n. 5, p. 520–527, 2014.

YALCIN, I.; BOHREN, Y.; WALTISPERGER, E.; SAGE-CIOCCA, D.; YIN, J. C.; FREUND-MERCIER, M. J.; BARROT, M. A time-dependent history of mood disorders in a murine model of neuropathic pain. **Biological Psychiatry**, [s. l.], v. 70, n. 10, p. 946–953, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biopsych.2011.07.017>>

YOUNIS, S.; MAARBJERG, S.; REIMER, M.; WOLFRAM, F.; OLESEN, J.; BARON, R.; BENDTSEN, L. Quantitative sensory testing in classical trigeminal neuralgia - A blinded study in patients with and without concomitant persistent pain. **Pain**, [s. l.], v. 157, n. 7, p. 1407–1414, 2016.

ZAKRZEWSKA, J. M.; MCMILLAN, R. Trigeminal neuralgia: The diagnosis and management of this excruciating and poorly understood facial pain. **Postgraduate Medical Journal**, [s. l.], v. 87, n. 1028, p. 410–416, 2011.

ZAKRZEWSKA, J. M.; WU, J.; MON-WILLIAMS, M.; PHILLIPS, N.; PAVITT, S. H. Evaluating the impact of trigeminal neuralgia. [s. l.], v. 1, p. 1166–1174, 2017.



ZHANG, W.; CLINE, M. a; GILBERT, E. R. Hypothalamus-adipose tissue crosstalk: neuropeptide Y and the regulation of energy metabolism. **Nutrition & metabolism**, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 27, 2014. Disponível em: <<http://www.ebscohost.com>>

ZHANG, Y.; BUTELMAN, E. R.; SCHLUSSMAN, S. D.; HO, A.; KREEK, M. J. Effects of the plant-derived hallucinogen salvinorin A on basal dopamine levels in the caudate putamen and in a conditioned place aversion assay in mice: Agonist actions at kappa opioid receptors. **Psychopharmacology**, [s. l.], v. 179, n. 3, p. 551–558, 2005.

ZHUO, M. Neural Mechanisms Underlying Anxiety-Chronic Pain Interactions. **Trends in Neurosciences**, [s. l.], v. 39, n. 3, p. 136–145, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tins.2016.01.006>>

## ANEXO – CERTIFICADO CEUA



Ministério da Educação  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
Setor de Ciências Biológicas  
Comissão de Ética no Uso de Animais  
(CEUA)



Nº 1198

### CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (CEUA/BIO – UFPR), instituída pela Resolução Nº 86/11 do Conselho de Ensino Pesquisa e Extensão (CEPE), de 22 de dezembro de 2011, **CERTIFICA** que os procedimentos utilizando animais no projeto de pesquisa abaixo especificado estão de acordo com a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para fins Científicos e Didáticos (DBCA) estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e com as normas internacionais para a experimentação animal.

### STATEMENT

The Ethics Committee for Animal Use from the Biological Sciences Section of the Federal University of Paraná (CEUA/BIO – UFPR), established by the Resolution Nº 86/11 of the Teaching Research and Extension Council (CEPE) on December 22<sup>nd</sup> 2011, **CERTIFIES** that the procedures using animals in the research project specified below are in agreement with the Brazilian Guidelines for Care and Use of Animals for Scientific and Teaching purposes

- established by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and with the international guidelines for animal experimentation.

**PROCESSO/PROCESS:** 23075.032860/2018-71

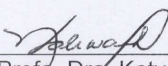
**APROVADO/APPROVAL:** 31/07/2018 – R.O. 06/2018

**TÍTULO:** Estudo do papel dos receptores Kappa opióides na ansiedade e na hiperalgesia mecânica em modelo animal de neuralgia do trigêmio em ratos.

**TITLE:** The role of the Kappa opioid receptor in anxiety and mechanical hyperalgesia in animal model of trigeminal in rats.

**AUTORES/AUTHORS:** Juliana Geremias Chichorro, Joelle de Melo Turnes, Erika Ivanna Araya, Amanda Ribeiro Barroso.

**DEPARTAMENTO/DEPARTMENT:** Farmacologia

  
Prof. Dra. Katya Naliwaiko  
Coordenadora da CEUA